

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくとも1つのエンハンサーと少なくとも1つのプロモーターとが作動可能に結合したBドメイン欠失第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列を含有する組み換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクター。

【請求項2】 スペーサーDNAをさらに含有する請求項1に記載のrAAVベクター。

【請求項3】 前記rAAVが、血清型1と、血清型2と、血清型3と、血清型4と血清型5とからなる群から選択される、請求項1に記載のrAAVベクター。

【請求項4】 前記Bドメイン欠失第VIII因子がヒトBドメイン欠失第VIII因子である、請求項1に記載のrAAVベクター。

【請求項5】 前記異種ヌクレオチド配列が、配列番号2に示すアミノ酸配列を有するBドメイン欠失第VIII因子をコードする、請求項4に記載のrAAVベクター。

【請求項6】 前記異種ヌクレオチド配列が、配列番号1に示すヌクレオチド配列中のヌクレオチド419位から4835位の配列を有する、請求項4に記載のrAAVベクター。

【請求項7】 前記プロモーターがAAV ITRである、請求項1に記載のrAAVベクター。

【請求項8】 請求項1に記載のrAAVベクターを製薬学的に許容されうる担体中に含有する医薬製剤。

【請求項9】 肝臓選択的発現制御因子が作動可能に結合した第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列を含有する組み換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)ベクター。

【請求項10】 前記異種ヌクレオチド配列が、配列番号1に示すヌクレオチド配列中のヌクレオチド419位から4835位の配列を有する、請求項9に記載のrAAVベクター。

【請求項11】 前記肝臓選択的発現制御因子が、 $\alpha$ 1ミクログロブリン/ビクニンエンハンサーと、B型肝炎ウイルスEnhIエンハンサーと、B型肝炎ウイルスEnhIIエンハンサーと、ヒトアルブミンE<sub>1</sub>エンハンサーとヒトアルブミンE<sub>6</sub>エ

ンハンサーとからなる群から選択される少なくとも1つのエンハンサーを含有する、請求項9に記載のrAAVベクター。

【請求項12】 前記肝臓選択的発現制御因子が、配列番号1に示すヌクレオチド配列中のヌクレオチド419位から4835位の配列を有するB型肝炎ウイルスEnhIエンハンサーを含有する、請求項9に記載のrAAVベクター。

【請求項13】 前記肝臓選択的発現制御因子が、B型肝炎ウイルスコアプロモーターと、マウスアルブミンプロモーターと、ヒトUI snRNAプロモーターと単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼプロモーターとからなる群から選択される少なくとも1つのプロモーターを含有する、請求項9に記載のrAAVベクター。

【請求項14】 前記肝臓選択的発現制御因子がTATAボックスと、CAATボックスと、GCボックスと、ATFボックスと、C/EBP結合部位と、HNF1結合部位と、HNF2結合部位と、HNF3結合部位と、HNF4結合部位とTGT3結合部位とからなる群から選択される少なくとも1つの転写因子結合部位を含有する、請求項9に記載のrAAVベクター。

【請求項15】 前記異種ヌクレオチド配列が、プロモーターをコードする配列とポリアデニル化配列とをさらに含有する、請求項9に記載のrAAVベクター。

【請求項16】 前記異種ヌクレオチド配列が、配列番号1に示すヌクレオチド配列中のヌクレオチド150位から4914位の配列を含有する、請求項9に記載のrAAVベクター。

【請求項17】 前記異種ヌクレオチド配列が配列番号2に示すアミノ酸配列をコードする、請求項9に記載のrAAVベクター。

【請求項18】 エンハンサーが作動可能に結合したBドメイン欠失第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列を含有する組み換えアデノ随伴ウイルス、(rAAV)ベクターであって、前記ヌクレオチド配列が、

(a) 配列番号1に示すヌクレオチド配列のヌクレオチド419～4835として与えられるヌクレオチド配列と、

(b) 高度にストリンジェントな条件下において(a)のヌクレオチド配列にハイブリダイゼーションし、Bドメイン欠失第VIII因子をコードするヌクレオチド

配列と、

(c) 遺伝コードの縮重により上記の(a)および(b)のヌクレオチド配列と異なり、Bドメイン欠失第VIII因子をコードするヌクレオチド配列とからなる群から選択される組み換えアデノ随伴ウィルス (rAAV) ベクター。

【請求項19】 前記rAAVがスペーサーDNAをさらに含有する、請求項18に記載のrAAVベクター。

【請求項20】 Bドメイン欠失第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列を含有する少なくとも約 $10^{12}$ の組み換えアデノ随伴ウィルス (rAAV) ベクター粒子群を含有する組成物。

【請求項21】 Bドメイン欠失第VIII因子をコードするヌクレオチド配列を細胞に送達する方法であって、肝臓選択的発現制御因子が作動可能に結合したBドメイン欠失第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列を含有する組み換えアデノ随伴ウィルス (rAAV) ベクターを該細胞に接触させるステップを含む方法。

【請求項22】 前記の接触させるステップがインビトロにおいて実施される、請求項21に記載の方法。

【請求項23】 前記の接触させるステップがインビボにおいて実施される、請求項21に記載の方法。

【請求項24】 前記細胞が、神経細胞と、肝細胞と、筋肉細胞と、網膜細胞と、上皮細胞と、線維芽細胞と、生殖細胞と、骨髄細胞と、造血幹細胞と、脾細胞と、膵臓細胞と中枢神経系細胞とからなる群から選択される、請求項21に記載の方法。

【請求項25】 前記細胞が肝細胞である請求項24に記載の方法。

【請求項26】 前記細胞がヒト細胞である、請求項21に記載の方法。

【請求項27】 前記肝臓選択的発現制御因子が、 $\alpha 1$ ミクログロブリン/ビクニンエンハンサーと、B型肝炎ウィルスEnhIエンハンサーと、B型肝炎ウィルスEnhIIエンハンサーと、ヒトアルブミンE<sub>1</sub>エンハンサーとヒトアルブミンE<sub>2</sub>エンハンサーとからなる群から選択される少なくとも1つのエンハンサーを含有する、請求項21に記載の方法。

【請求項28】 前記肝臓選択的発現制御因子が、配列番号1に示すヌクレオチド配列中のヌクレオチド419位から4835位の配列を有するB型肝炎ウイルスEnhIエンハンサーを含有する、請求項21に記載の方法。

【請求項29】 前記肝臓選択的発現制御因子が、B型肝炎ウイルスコアプロモーターと、マウスアルブミンプロモーターと、ヒトU1 snRNAプロモーターと単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼプロモーターとからなる群から選択される少なくとも1つのプロモーターを含有する、請求項21に記載の方法。

【請求項30】 前記肝臓選択的発現制御因子がTATAボックスと、CAATボックスと、GCボックスと、ATFボックスと、C/EBP結合部位と、HNF1結合部位と、HNF2結合部位と、HNF3結合部位と、HNF4結合部位とTGT3結合部位とからなる群から選択される少なくとも1つの転写因子結合部位を含有する、請求項21に記載の方法。

【請求項31】 前記AAV ITRが、Bドメイン欠失第VIII因子をコードする前記ヌクレオチド配列を発現させるように、前記rAAVベクターが、Bドメイン欠失第VIII因子をコードする前記ヌクレオチド配列に作動可能に結合した少なくとも1つのAAV ITRをさらに含有する、請求項21に記載の方法。

【請求項32】 前記Bドメイン欠失第VIII因子はヒトBドメイン欠失第VIII因子である、請求項21に記載の方法。

【請求項33】 前記異種ヌクレオチド配列が、配列番号2に示すアミノ酸配列を有するBドメイン欠失第VIII因子をコードする、請求項32に記載の方法。

【請求項34】 前記異種ヌクレオチド配列が、配列番号1に示すヌクレオチド配列のヌクレオチド約419～4835として与えられる配列を有する、請求項33に記載の方法。

【請求項35】 Bドメイン欠失第VIII因子をコードするヌクレオチド配列を細胞に送達する方法であって、

(a) 配列番号1に示すヌクレオチド配列のヌクレオチド419～4835として与えられるヌクレオチド配列と、

(b) 高度にストリッジェントな条件下において(a)のヌクレオチド配列にハイブリダイゼーションし、Bドメイン欠失第VIII因子をコードするヌクレオチド

配列と、

(c) 遺伝コードの縮重により上記の(a)および(b)のヌクレオチド配列と異なり、Bドメイン欠失第VIII因子をコードするヌクレオチド配列とからなる群から選択されるBドメイン欠失第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列を含有する組み換えアデノ随伴ウィルス (rAAV) ベクターを該細胞に接触させるステップを含む方法。

【請求項36】 Bドメイン欠失第VIII因子をコードするヌクレオチド配列を細胞に送達する方法であって、Bドメイン欠失第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列を含有する組み換えアデノ随伴ウィルス (AAV) ベクター群を含有する組成物を該細胞に接触させるステップを含み、前記組成物が1ミリリッターあたり少なくとも約 $10^8$ 感染単位の方価を有する方法。

【請求項37】 必要としている被検者において血液凝固を増強する方法であって、Bドメイン欠失第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列を含有し、血液凝固を増強するのに十分な量の組み換えアデノ随伴ウィルス (rAAV) ベクターを該被検者に投与するステップを含む方法。

【請求項38】 少なくとも約 $2 \times 10^{10}$ 粒子の前記rAAVベクターを前記被検者に投与する、請求項37に記載の方法。

【請求項39】 前記被検者が哺乳類被検者である、請求項37に記載の方法。

【請求項40】 前記被検者がヒト被検者である、請求項39に記載の方法。

【請求項41】 前記rAAVベクターが、経口投与と、直腸投与と、経粘膜投与と、経皮投与と、吸入投与と、静脈内投与と、皮下投与と、皮内投与と、頭蓋内投与と、筋肉内投与と関節内投与とからなる群から選択される経路によって投与される、請求項40に記載の方法。

【請求項42】 前記rAAVが前記被検者の肝臓に投与される、請求項41に記載の方法。

【請求項43】 前記rAAVが、静脈内投与と、門脈内投与と、胆嚢内投与と、動脈内投与と肝実質細胞とへの直接注射からなる群から選択される経路によって前記肝臓に投与される、請求項44に記載の方法。

【請求項44】 前記rAAVが、第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列が作動可能に結合した肝臓選択的発現制御因子をさらに含有する、請求項37に記載の方法。

【請求項45】 前記肝臓選択的発現制御因子が、 $\alpha 1$ ミクログロブリン/ビクニンエンハンサーと、B型肝炎ウィルスEnhIエンハンサーと、B型肝炎ウィルスEnhIIエンハンサーと、ヒトアルブミンE<sub>1</sub>エンハンサーとヒトアルブミンE<sub>2</sub>エンハンサーとからなる群から選択される少なくとも1つのエンハンサーを含有する、請求項44に記載の方法。

【請求項46】 前記肝臓選択的発現制御因子が、B型肝炎ウィルスエンハンサー因子EnhIまたはB型肝炎ウィルスエンハンサー因子EnhIIである、請求項45に記載の方法。

【請求項47】 前記Bドメイン欠失第VIII因子がヒトBドメイン欠失第VIII因子である、請求項37に記載の方法。

【請求項48】 前記異種ヌクレオチド配列が、配列番号2に示す配列を有するBドメイン欠失第VIII因子をコードする、請求項47に記載の方法。

【請求項49】 前記異種ヌクレオチド配列が配列番号2に示すアミノ酸配列をコードする、請求項48に記載の方法。

【請求項50】 Bドメイン欠失第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列を含有する生物学的に有効な量の組み換えアデノ随伴ウィルス(rAAV)を血友病被検者に投与するステップを含み、前記Bドメイン欠失第VIII因子は治療的に有効な量が発現される、血友病Aを治療する方法。

【請求項51】 Bドメイン欠失第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列を含有する生物学的に有効な量の組み換えアデノ随伴ウィルス(rAAV)を血友病被検者の肝臓に投与するステップを含む、血友病を治療する方法。

【請求項52】 前記肝臓が、コードされているBドメイン欠失第VIII因子を発現し、該Bドメイン欠失第VIII因子が治療的に有効な量血中に分泌される、請求項51に記載の方法。

【請求項53】 Bドメイン欠失第VIII因子を発現する細胞を被検者に投与するステップを含む、Bドメイン欠失第VIII因子を被検者に投与する方法であつ

て、Bドメイン欠失第VIII因子をコードするヌクレオチド配列を含有する組み換えアデノ随伴ウィルス (rAAV) ベクターを該細胞に接触させるステップを含む方法によって細胞が生産されている方法。

【請求項54】 前記細胞が、造血幹細胞と、肝細胞と、線維芽細胞と、上皮細胞と、脾細胞と、膵臓細胞と、ケラチン細胞と、内皮細胞と、筋原細胞と神経細胞とからなる群から選択される、請求項53に記載の方法。

【請求項55】 高力価の組み換えアデノ随伴ウィルス (rAAV) ベクターを生産する方法であって、

(a) 第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列を含有するrAAVベクターをパッケージング細胞に感染させるステップと、

(b) パッケージング細胞によってrAAVゲノムを複製し、封入するステップと、

(c) rAAV粒子を回収してrAAVストックを形成するステップであって、該rAAVストックの力価が1ミリリットルあたり少なくとも約 $10^6$ 感染単位であるステップとを含む方法。

【請求項56】 第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列に肝臓選択的発現制御因子が作動可能に結合している、請求項55に記載の方法。

【請求項57】 請求項55に記載の方法によって作製されるウィルスストック。

【請求項58】 肝炎ウィルス発現制御因子が作動可能に結合したBドメイン欠失第VIII因子をコードするヌクレオチド配列。

【請求項59】 前記肝炎ウィルス発現制御因子がB型肝炎ウィルス由来である、請求項58に記載のヌクレオチド配列。

【請求項60】 前記肝炎ウィルス発現制御因子がB型肝炎ウィルスEnhIまたはEnhIIエンハンサーである、請求項59に記載のヌクレオチド配列。

【請求項61】 前記肝炎ウィルス発現制御因子がB型肝炎ウィルスEnhIエンハンサーである、請求項60に記載のヌクレオチド配列。

【請求項62】 前記ヌクレオチド配列が、配列番号1に示すヌクレオチド



配列中のヌクレオチド150位から4835位の配列を有する、請求項58に記載のヌクレオチド配列。

【請求項63】 前記ヌクレオチド配列が、プロモーターとポリアデニル化配列とをさらに含有する、請求項62に記載のヌクレオチド配列。

【請求項64】 前記ヌクレオチド配列が配列番号1に示すヌクレオチド配列のヌクレオチド150～4914として与えられる配列を有する、請求項63に記載のヌクレオチド配列。

【請求項65】 請求項58に記載のヌクレオチド配列を含有するベクター。

【請求項66】 前記ベクターが、本明細書においてpDLZ6として開示されている、請求項65に記載のベクター。

【請求項67】 請求項65に記載のベクターを含有する細胞。

【請求項68】 請求項67に記載の細胞が、本明細書において、*Escherichia coli*として開示されている、請求項67に記載の細胞。

【請求項69】 請求項67に記載の細胞が、本明細書において、*Yeast*として開示されている、請求項67に記載の細胞。

【請求項70】 請求項67に記載の細胞が、本明細書において、*Saccharomyces cerevisiae*として開示されている、請求項67に記載の細胞。

【請求項71】 請求項67に記載の細胞が、本明細書において、*Aspergillus niger*として開示されている、請求項67に記載の細胞。

【請求項72】 請求項67に記載の細胞が、本明細書において、*Trichoderma reesei*として開示されている、請求項67に記載の細胞。

【請求項73】 請求項67に記載の細胞が、本明細書において、*Penicillium chrysogenum*として開示されている、請求項67に記載の細胞。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 〔技術分野〕

本発明は、第VIII因子を提供する試薬および方法に関し、さらに詳細には、第VIII因子を提供するウィルス試薬および方法に関する。

## 【0002】

## 〔背景技術〕

血友病Aは、第VIII凝固因子（第VIII因子）の欠陥によって生ずる遺伝性の伴性出血性疾患である。血友病Aは血友病患者の大半（80%）を占め、発現頻度は5～10,000例の男児出産例に対して1例の割合である（Antonarakis et al (1998) Haemophilia 4:1）。血友病患者は、大型の関節、軟組織での特発出血を生じ、頭蓋内出血の危険がある。特に、重症の罹患患者では、関節出血の反復して起こる発作は、重大な関節症に至る、この疾患の最もよく見られる兆候である。

## 【0003】

遺伝子治療は、血友病A患者を治療する魅力的な方法の1つである。ヒト第VIII因子の永続的な発現は、治療レベルより低いレベル（正常の5%にほぼ等しいかまたはそれ以上）であっても血友病A患者の治療に顕著な影響を与えられると思われる。レトロウィルスベクターおよびアデノウィルスベクターは第VIII因子cDNAを送達するために使用されている（Dwarki et al. (1995) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 92: 1023; Connelly et al. (1998) Blood 91: 3273; Connelly et al. (1996) Blood 87: 4671）。モロニーマウス白血病ウィルス（MoMLv）両種指向性（amphotropic）ベクターは、分裂後細胞の形質導入が不良である（Dwarki et al. (1995) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 92: 1023）。肝臓に向かうヒト第VIII因子cDNAを搬送するアデノウィルスは動物モデルにおいて高レベルの第VIII因子を発現する。しかし、発現は、よく調べられている、そのベクターに対する細胞性免疫応答により経時的に弱くなる（Connelly et al. (1996) Blood 87: 4671; Connelly et al. (1996) Blood 88: 3846）。このような免疫応答は患者に重篤な結果をもたらすことがある。免疫応答により炎症、細胞死が生じ、患者が死亡することもある。

## 【0004】

アデノ随伴ウイルスは、広範囲の分裂細胞または分裂終了細胞に感染することができる非病原性欠陥パルボウイルスである(Rabinowitz et al. (1998) *Current Opinion in Biotechnology* 9: 470)。rAAVは、第VIII因子およびFIXが合成される(Wion et al. (1985) *Nature* 317:726; Zelechowska et al. (1985) *Nature* 317: 729)大型の動物モデルにおいて機能的FIX遺伝子を永続的に発現することができることが示されている(Snyder et al. (1999) *Nature Medicine* 6: 64)。

## 【0005】

rAAVベクターの欠点はパッケージング能力が小さいことである(Dong et al. (1996) *Human Gene Therapy*, 7: 2101)。野生型(wt)AAVは4.6 kbの鎖状1本鎖DNAウイルスである。AAVベクターの総サイズが、AAVビリオンへのパッケージング効率に影響を与える。Dongらは、ウイルス粒子のDNA含有量を定量し、AAVビリオンがCAT遺伝子をHeLa細胞に導入する効率をアッセイすることによって、AAVベクターのパッケージング効率を求めた。Dongらが求めた効率的なパッケージングには、トランスジーンを含有し、発現する粒子が含まれる。その結果は、AAVのパッケージング効率はゲノムの長さに影響されることを証明している。

## 【0006】

ヒト第VIII因子遺伝子は、中心のBドメインコアと、これに隣接するアミノA1およびA2ドメインとカルボキシルA3、C1およびC2ドメインを含有する。Bドメインは、特定の前凝固活性にいかなる重要な影響も与えずに、欠損できる(Pittman et al. (1993) *Blood* 81: 2925)。しかし、Bドメイン欠失ヒト第VIII因子cDNA (Bドメイン欠失ヒト第VIII因子)でも、その4.4 kbのサイズではrAAVベクターの限られた領域内への効率的なパッケージングができないと考えられるので(Kay and High(1999) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96: 9973)、rAAVでの試験に適するとは考えられない(Pittman et al. (1993) *Blood* 81: 2925)。このように、高力価AAV Bドメイン欠失ヒト第VIII因子ベクターの作製は非常に困難であると思われる(Kay and Russell(1999) *Blood* 94:864)。

## 【0007】

血友病Aを治療する体細胞遺伝子治療は、第VIII因子遺伝子の発現に付随する

困難さによってさらに複雑となっている。永続的なヒト第VIII因子発現は、ヒト第VIII因子遺伝子の転写効率の不良 (Connelly et al. (1996) Blood 91: 3846; Rabinowitz et al (1998) Current Opinion in Biotechnology 9:470) や、第VIII因子タンパク質の分泌効率の悪さ (Snyder et al. (1999) Nature Medicine 5: 64; Wion et al. (1985) Nature 317: 726) および第VIII因子タンパク質の比較的短い半減期 ( $t_{1/2} \sim 12$ 時間; Wion et al. (1985) Nature 317: 726; Zelechowska et al. (1985) Nature 317: 729) により妨害されることが証明されている。

#### 【0008】

従って、血友病Aを治療する試薬および方法の改良の必要性が当該技術上において存在する。

#### 【0009】

##### 〔発明の概要〕

被検者において生物学的に活性な第VIII因子タンパク質（第VIII因子）を発現する組成物および方法を提供する。本発明の組成物および方法は、被検者の凝固疾患、特に血友病Aを治療する際に有用である。本発明の組成物は、少なくとも1つのエンハンサーと少なくとも1つのプロモーターとが作動可能に結合したBドメイン欠失第VIII因子をコードするヌクレオチド配列を含有する組み換えAAV (rAAV) ベクターを含有する。ある実施態様では、AAV ITRは、ITRがBドメイン欠失第VIII因子トランスジーンを発現させるように、Bドメイン欠失第VIII因子をコードするヌクレオチド配列に作動可能に結合する。ベクターはまた、転写因子結合部位またはターミネーション領域あるいはそれらの両方を含有してもよい。必要に応じて、スペーサーDNAはカセット内に含有されてもよい。本発明のrAAVベクターは、インビボにおいて、治療レベルの第VIII因子タンパク質を長期間発現することができる生物学的に活性なBドメイン欠失第VIII因子タンパク質をコードする。従って、本発明はrAAVベクターの多数の利点を利用するとともに、AAVカプシドのパッケージング能力の低さによって生じる制約を克服している。

#### 【0010】

本発明の別の態様は、(a) 図1の（配列番号1にも示す）ヌクレオチド約419～4835と、(b) 高度にストリンジェントな条件下において(a)のヌクレオチド配列と

ハイブリダイゼーションし、Bドメイン欠失第VIII因子をコードするヌクレオチド配列および、(c)遺伝コードの縮重により上記(a)および(b)のヌクレオチド配列と異なり、Bドメイン欠失第VIII因子をコードするヌクレオチド配列とからなる群から選択されるBドメイン欠失第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列を含有するrAAVベクターである。

#### 【0011】

本発明はまた、Bドメイン欠失第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列をインビトロおよびインビボにおいて細胞に送達する方法を提供する。従って、一実施態様において、Bドメイン欠失第VIII因子をコードするヌクレオチド配列を細胞に送達する方法であって、肝臓選択的 (liver-preferred) 発現制御因子が作動可能に結合した第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列を含有するrAAVベクターを細胞に接触させるステップを含む方法が提供される。接触させるステップはインビトロおよびインビボにおいて実施されてもよい。

【0012】 本発明はまた、Bドメイン欠失第VIII因子をコードするヌクレオチド配列を細胞に送達する方法であって、本発明のrAAVベクターを細胞に接触させるステップを含む方法である。

さらに別の実施態様は、Bドメイン欠失第VIII因子をコードするヌクレオチド配列を細胞に送達する方法であって、本発明のrAAVベクターを細胞に接触させるステップを含む方法である。(a)図1の(配列番号1にも示す)ヌクレオチド約419～4835と、(b)高度にストリンジেন্টな条件下において(a)のヌクレオチド配列とハイブリダイゼーションし、Bドメイン欠失第VIII因子をコードするヌクレオチド配列と(c)遺伝コードの縮重により上記(a)および(b)のヌクレオチド配列と異なり、Bドメイン欠失第VIII因子をコードするヌクレオチド配列とからなる群から選択されるBドメイン欠失第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列を含有するrAAVベクター。

【0013】 本発明はまた、Bドメイン欠失第VIII因子をコードするヌクレオチド配列を細胞に送達する方法であって、本発明のrAAVベクターを細胞に接触させるステップを含む方法である。

よりさらに別の態様では、本発明は、Bドメイン欠失第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列を含む生物学的に有効な量のrAAVベクターを血友病被検者に投与するステップを含む、血友病Aを治療する方法を提供する。好ましくは、コードされているBドメイン欠失第VIII因子は治療的に有効な量が発現される。

#### 【0014】

さらに別の実施態様において、本発明は、Bドメイン欠失第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列を含有する生物学的に有効な量のrAAVを血友病被検者の肝細胞に投与するステップを含む、血友病を治療する方法を提供する。好ましくは、コードされているBドメイン欠失第VIII因子は形質導入された肝細胞によって発現され、治療的に有効な量が血中に分泌される。

【0015】

よりさらに別の実施態様として、本発明は、第VIII因子を発現する細胞を被検者に投与するステップを含む、第VIII因子を被検者に投与する方法であって、本発明の組み換えアデノ随伴ウィルス (AAV) ベクターを細胞に接触させるステップを含む方法によって細胞が生産されている方法を提供する。

【0016】

本発明は、(a)第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列を含有するrAAVベクターをパッケージング細胞に感染するステップと、(b)パッケージング細胞によってrAAVゲノムを複製し、封入するステップと、(c)rAAV粒子を回収してrAAVストックを形成するステップとを含む、高力価rAAVベクターストックを生産する方法をさらに提供する。示すように、Bドメイン欠失第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列には肝臓選択的 (liver-preferred) 発現制御因子が作動可能に結合している。上述の方法によって作製される高力価ウィルスストックも提供される。

【0017】

本発明のrAAVベクターを感染することによって、安定な細胞株を生産する方法も提供される。このような細胞株は、ベクターのトランスフェクション、分泌、次に個々のコロニーのクローニングを実施することによって作製される。次いで、ベクターの高レベル複製を示すクローンを感染性ベクターの生産について試験する。この細胞株はBドメイン欠失第VIII因子を発現することができる。

【0018】

本発明の別の態様は、肝炎ウィルス発現制御因子が作動可能に結合した第VIII因子をコードするヌクレオチド配列である。ある実施態様において、この発現制御因子はB型肝炎由来であり、肝炎EnhIエンハンサーとEnhIIエンハンサーとから

選択されるエンハンサーの少なくとも1つを含有する。ヌクレオチド配列は、少なくとも1つのプロモーターとポリアデニル化配列とをさらに含有してもよい。ある実施態様において、少なくとも1つのプロモーターはAAV ITRである。本発明はまた、肝炎ウイルス発現制御因子が作動可能に結合した第VIII因子をコードするヌクレオチド配列を含有するベクターと、このベクターを含有する宿主細胞とを含む。

【0019】本発明のこれらの態様および他の態様は以下の発明の説明において、より詳細に提供されている。

【0020】  
[発明の詳細な説明]  
本発明は、第VIII因子欠損に関連する症状を軽減する組成物と方法とを提供する。組成物は、少なくとも1つのエンハンサーと少なくとも1つのプロモーターとが作動可能に結合したBドメイン欠失第VIII因子をコードするヌクレオチド配列を含有するrAAVベクターを含有する。ある実施態様において、本発明のベクターは、肝臓選択的 (liver-preferred) 発現制御因子を含有する。スパーサーDNAおよび3'側ターミネーション領域がカセット内に含有されてもよい。

【0021】本発明を任意の作用機序に結び付けるのではないが、好ましい実施態様において、ITR領域またはAAV内の領域は第VIII因子ヌクレオチド配列を発現させるプロモーターとして働くと考えられている。すなわち、AAVゲノムの両端に見られる逆方向反復塩基配列 (ITRs) の少なくとも1つは、Bドメイン欠失第VIII因子配列を発現させるために使用される。例えば、引用することにより本発明の一部をなすものとする米国特許第5,866,696号参照。

【0022】以下の定義は、本明細書および添付の請求の範囲に記載する本発明を理解するために使用されるように提供されている。

【0023】  
「発現制御因子」は、その発現制御因子が機能させられる宿主細胞において、

作動可能に結合したポリヌクレオチドの転写を増加させるポリヌクレオチド配列、好ましくは、DNA配列である。発現制御因子はエンハンサー、プロモーターおよび/または転写因子結合部位を含有してもよい。肝臓選択的 (liver-preferred) 転写調節因子は、肝臓以外の細胞と比較したとき、肝臓細胞において作動可能に結合したポリヌクレオチド配列の転写を増加する発現制御因子である。

#### 【0024】

「第VIII因子関連疾患」は、不十分なレベルの第VIII因子に関連する、それによって生じるおよび/またはそれに応答して生ずるような疾患または疾病である。このような疾患には、血友病Aが含まれるが、それに限定されない。

#### 【0025】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、任意の長さのアミノ酸のポリマーを言うために本明細書において使用され、交換可能である。この用語はまた、例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化または標識化合物との接合のように修飾されたアミノ酸ポリマーも含む。

#### 【0026】

本明細書において使用され、交換可能である「ポリヌクレオチド」、「ヌクレオチド配列」および「核酸」という用語は、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドまたはそれらの類似体を含む、任意の長さのポリマー形態のヌクレオチドを言う。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体などの修飾ヌクレオチドを含んでもよく、非ヌクレオチド成分が構造の間に入ってもよい。ヌクレオチド構造の修飾が存在する場合には、ポリマー形成の前または後に修飾が起きてもよい。本明細書において使用される「ポリヌクレオチド」という用語は、2本鎖および1本鎖分子をいい、交換可能である。特に明記しない限りまたは必要でない限り、ポリヌクレオチドと本明細書において記載する本発明の任意の実施態様は、2本鎖形態および2本鎖形態を形成することが既知または予測される2つの相補的な1本鎖形態の各々を含む。

#### 【0027】

「AAV」はアデノ随伴ウィルスの略語であり、そのウィルス自体またはその誘導体を言うために使用することができる。この用語は、そうでないことが必要で



ある場合を除いて、全てのサブタイプ並びに天然型および組み換え型を含む。「AAV」は野生型および組み換え型 (rAAV) のアデノ随伴ウイルスを言い、突然変異型のAAVを含む。AAVという用語にはさらに、AAV 1型、AAV 2型、AAV 3型、AAV 4型、AAV 5型、AAV 6型、AAV 7型、トリAAV、ウシAAV、イヌAAV、ウマAAVおよびヒツジAAVが含まれるが、それらに限定されない (例えば、Fields et al., Volume 2, Chapter 69 (3d ed., Lippincott-Raven Publishers参照)。好ましい実施態様において、現在の本発明で使われているAAVはAAV 2型である。

【0028】本発明の「アデノ随伴ウイルス逆方向反復塩基配列」または「AAV ITRs」は、

「アデノ随伴ウイルス逆方向反復塩基配列」または「AAV ITRs」は、AAVゲノムの両端に見られるパリンδροーム領域を意味する。ITRsは、ウイルスのDNA複製起点として、並びにパッケージングシグナルとしてcis型で一体として機能する。本発明で使用するには、隣接するAAV ITRsは、エンハンサーおよび、必要に応じてスペーサーDNAまたはプロモーター因子が、作動可能に結合したBドメイン欠失第VIII因子コード配列を含むカセットの5'側および3'側に位置づけられる。ある実施態様において、AAV ITRは、Bドメイン欠失第VIII因子をコードするヌクレオチド配列を発現させるように、この配列に作動可能に結合する。

#### 【0029】

AAV ITR領域のヌクレオチド配列は既知である。AAV-2配列は、例えば、Kotin, R. M. (1994) Human Gene Therapy 5: 793-801; Bems, "Parvoviridae and Their Replication", in Fundamental Virology, 2nd ed. (ed. Fields and Knipe) 参照。本明細書において使用する「AAV ITR」は、示されている野生型ヌクレオチド配列を有する必要はないが、例えば、ヌクレオチドの挿入、欠失または置換によって変更されてもよい。また、AAV ITRは、AAV-1、AAV-2、AAV-3、AAV-4、AAV-5、AAV-6、AAV-7等を含むが、これらに限定されない、いくつかのAAV血清型のいずれかに由来してもよい。意図されるように機能する限り、すなわち、rep遺伝子が (同じベクターまたは異なるベクターに) 存在する場合またはRep発現産物が標的細胞中に存在する場合に、関連する異種配列を標的細胞のゲノムに導入することができる限り、第VIII因子コード配列を含有する選択した異種ヌクレオチド配列に隣接する5'側および3'側ITRsは、必ずしも同じである必要はなく、

また同じAAV血清型または単離体から誘導される必要はない。最近の証拠は、2つのITRsを含有する構成物に通常関連する機能を実施するのに1つのITRで十分であり（米国特許第5,478,745号）、ITRを1つだけ含有するベクター構築物を本明細書において記載するパッケージングおよび作製方法と合わせて使用することができることを示唆している。

#### 【0030】

本発明のrAAVベクターの「生物学的に有効な」量は、標的組織または器官の少なくとも1つの細胞による、Bドメイン欠失第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列の形質導入および発現を生ずるのに十分である量である。

#### 【0031】

本明細書において使用する「rAAVベクター」、「rAAVウィルス」または「rAAVウィルス粒子」は、少なくとも1つのAAVカプシドタンパク質（好ましくは、野生型AAVのカプシドタンパク質の全てによる）およびAAVそのものではないポリヌクレオチド配列（すなわち、AAVと異種のポリヌクレオチド）、典型的には、細胞の遺伝的形質転換にとって興味深い配列を含有する封入化rAAVを含有する。異種ポリヌクレオチドには、少なくとも1つ、好ましくは2つのAAV逆方向反復塩基配列(ITRs)が隣接する。

#### 【0032】

「パッケージング」は、AAV粒子またはrAAV粒子の形成および封入を生ずる一連の細胞内現象を言う。rAAV粒子の場合には、パッケージングは、トランスジェンを含む、rAAV粒子の形成および封入化を言う。

#### 【0033】

AAV「rep」および「cap」遺伝子は、アデノ随伴ウィルスの複製および封入化タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列をいう。それらは、検討した全てのAAV血清型に見られ、以下および当技術上記載されている。AAV repおよびcapは、本明細書において、AAV「パッケージング遺伝子」と言われる。

#### 【0034】

AAVの「ヘルパーウィルス」は、AAVの哺乳類細胞における複製およびパッケージングを可能とするウィルスを言う。アデノウィルス、ヘルペスウィルスおよび

ワクシニアなどのポックスウィルスを含む、AAVの種々のヘルパーウィルスが当技術上既知である。アデノウィルスは数多くの異なるサブグループを含むが、サブグループCのアデノウィルス5型が最も普通に使用される。ヒト起源、ヒト以外の哺乳類起源およびトリ起源の数多くのアデノウィルスが知られているが、ATCCなどの寄託機関を利用可能である。ヘルペスファミリーのウィルスには、例えば、単純ヘルペスウィルス(HSV)およびエプスタインバーウィルス(EBV)並びにサイトメガロウィルス(CMV)および仮性狂犬病ウィルス(PRV)が含まれ、これらもATCCなどの寄託機関を利用可能である。

### 【0035】

「感染性」ウィルスまたはウィルス粒子は、そのウィルス種が栄養性である細胞内に送達することができるポリヌクレオチド成分を含有するものである。この用語は、ウィルスの任意の複製能力を必ずしも意味しない。感染性ウィルス粒子を計測するアッセイは当技術上記載されている。

【0036】本明細書に記載される複製能力は、複製能力AAV、RCA、または「複製能力」ウィルス(例えば、複製能力AAV、RCA)と略されるときもある)は、感染性であり、感染した細胞内で(すなわち、ヘルパーウィルスまたはヘルパーウィルス機能の存在下において)複製することもできる表現型が野生型のウィルスを言う。AAVの場合には、複製能力は、一般に、機能的なAAVパッケージング遺伝子の存在を必要とする。本明細書において記載する好ましいrAAVベクターは、1つ以上のAAVパッケージング遺伝子の欠失のために、哺乳類細胞において(特にヒト細胞において)複製能力がない。好ましくは、このようなrAAVベクターは、AAVパッケージング遺伝子とrAAVベクターとの間の組み換えによってRCAが作製される可能性を最小にするために、いかなるAAVパッケージング遺伝子配列も欠失している。

### 【0037】

「遺伝子」は、転写および翻訳により、特定のタンパク質をコードすることができる少なくとも1つのオープンリーディングフレームを含有するポリヌクレオチドをいう。

### 【0038】

本明細書において使用する「発現」は、遺伝子の転写および/または翻訳をいう。

#### 【0039】

ポリヌクレオチドに適用される「組み換え」は、そのポリヌクレオチドが、天然に見出されるポリヌクレオチドとは別個の構築物を生じるクローニング、切断またはライゲーションステップの種々の組み合わせの産物であることを意味する。組み換えウィルスは、組み換えポリヌクレオチドを含有するウィルス粒子である。この用語は、もとのポリヌクレオチド構築物の複製物およびもとのウィルス構築物の子孫をそれぞれ含む。

#### 【0040】

「作動可能に結合する(operatively linked)」または「作動可能に結合する(operably linked)」または「作動可能に関連する(operably associated)」は、遺伝子要素が予測されたように機能できる関係にある遺伝子要素の並列を言う。例えば、プロモーターが、コード配列の転写の開始を助ける場合には、プロモーターはコード領域に作動可能に結合している。この機能的な関係が維持される限り、プロモーターとコード領域との間に残基が介在してもよい。

#### 【0041】

「異種(heterologous)」は、比較されているものとは遺伝子型が別個のもの由来であることを意味する。例えば、異なる種由来のプラスミドまたはベクターに遺伝子工作技法によって組み込まれるポリヌクレオチドは異種ポリヌクレオチドである。天然のコード配列から取り出され、天然には結合されていないコード配列に作動可能に結合されるプロモーターは異種プロモーターである。

#### 【0042】

「遺伝的改変」は、遺伝的要素が細胞に導入される、有糸分裂または減数分裂以外の過程を言う。要素は細胞にとって異種であっても、細胞にすでに存在する要素の追加のコピーまたは改良型であってもよい。遺伝的改変は、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降またはポリヌクレオチド-リボソーム複合体を接触させるなどの当技術上既知の任意の方法によって組み換えプラスミドまたは他のポリヌクレオチドを細胞にトランスフェクトすることによって実

施することができる。遺伝的改変はまた、例えば、DNAまたはRNAウィルスまたはウィルスベクターを形質導入または感染することによって実施することができる。好ましくは、遺伝的要素は、細胞の染色体またはミニ染色体に組み入れられるが、細胞およびその子孫の表現型および/または遺伝子型を変化させる任意の改変もこの用語に含まれる。

#### 【0043】

インビトロにおける細胞の長期培養中、遺伝子配列がその機能を実施するのに利用可能である場合には、細胞は遺伝子配列が「安定に」改変、形質導入または形質転換されていると言われる。好ましい例において、改変細胞の子孫によって受け継がれうる遺伝的改変が導入されているという点において、このような細胞は「遺伝的」に改変されている。

#### 【0044】

ポリヌクレオチドの細胞への「安定な導入」は、ポリヌクレオチドが、細胞内で安定に維持される傾向にあるレプリコンに組み込まれることを意味する。プラスミドなどのエピソームが何世代にわたって維持されうることもあるが、エピソームに搬送される遺伝材料は、一般に、染色体に組み込まれる材料よりも欠失されやすい。しかし、ポリヌクレオチドは、選択マーカーをポリヌクレオチド内またはポリヌクレオチドに隣接して組み込み、次いでそのポリヌクレオチドを保有する細胞を選択圧力下において培養することによって維持できることがしばしばある。ある場合では、配列は染色体内に組み込まれていないと安定に効果的に維持されない。従って、選択マーカーを含有する配列の保持に関して選択することにより、マーカーが染色体に安定に組み込まれている細胞を選択することができる。抗生物質抵抗性遺伝子は、当技術上周知であるように、このような選択マーカーとして便利に使用することができる。典型的には、安定に組み込まれたポリヌクレオチドは少なくとも約20世代、好ましくは少なくとも100世代維持されることが期待され、よりさらに好ましくは、それらは永久的に維持される。真核生物の染色体のクロマチン構造が組み込まれたポリヌクレオチドの発現レベルに影響を与えることもある。安定に維持される特定の遺伝子の多数のコピーを有することが望ましい場合には、安定に維持されるエピソームに遺伝子を保有させるこ

とが特に有用となり得る。本発明に関連して特に望ましい特性を有する安定な細胞株を選択することは以下に記載され、例示されている。

【0045】

「単離された」プラスミド、ウィルスまたは他の物質は、その物質または同様の物質が天然に存在するまたは最初に調製される場合に、同時に存在する可能性のある他の成分の少なくとも一部を含有しない物質の調製物を言う。従って、例えば、単離物質は、原料混合物から濃縮する精製技法を使用して調製することができる。濃縮は、溶液の容量あたりの重量などの絶対量で測定されてもよく、または原料混合物中に存在する妨害する可能性のある第二の物質に対して測定することもできる。本発明の実施態様では、濃縮が増すほどより好ましい。従って、例えば、2倍の濃縮が好ましく、10倍の濃縮はさらに好ましく、100倍の濃縮はさらに好ましく、1000倍の濃縮はよりさらに好ましい。

【0046】

rAAVの調製物は、感染性ヘルパーウィルス粒子に対する感染性rAAV粒子の割合が少なくとも約 $10^2$ :1、好ましくは少なくとも約 $10^4$ :1、さらに好ましくは少なくとも約 $10^6$ :1、よりさらに好ましくは少なくとも約 $10^8$ :1である場合にはヘルパーウィルスを「実質的に含有しない」と言われる。調製物はまた、好ましくは、等量のヘルパーウィルスタンパク質（すなわち、上記のヘルパーウィルス粒子不純物が崩壊した形態で存在する場合、このようなレベルのヘルパーウィルスの結果として存在するであろうタンパク質）を含有しない。ウィルスまたは細胞またはそれらの両方のタンパク質の混入は、一般に、SDSゲルのクーマシー染色バンドの存在として観察することができる（例えば、AAVカプシドタンパク質VP1、VP2およびVP3に相当するもの以外のバンドの出現）。

【0047】

「宿主細胞」は、ベクターのレシピエントまたはポリヌクレオチドまたはタンパク質またはそれらの両方を組み込むためのレシピエントとなり得るまたはレシピエントであった個々の細胞または細胞培養物を含む。宿主細胞は1つの宿主細胞の子孫を含み、子孫は、自然、偶発的または意図的な突然変異により元の親細胞と（形態および総DNA相補物のゲノムが）必ずしも全く同じでなくてもよい。

宿主細胞は、本発明のポリヌクレオチドをインビボにおいてトランスフェクトした細胞を含む。

【0048】

「肝細胞」は、実質細胞、非実質細胞、内皮細胞、上皮細胞等を含むが、これらに限定されない、肝臓組織に見られる任意の細胞種類を意図している。

【0049】

「形質転換」または「トランスフェクション」は、例えば、リポフェクション、形質導入、感染またはエレクトロポレーションのような挿入に使用する方法にかかわらず、宿主細胞に外因性ポリヌクレオチドを挿入することをいう。外因性ポリヌクレオチドは、例えば、プラスミドのような非組み込みベクターとして維持されてもよく、または宿主細胞ゲノムに組み込まれてもよい。

【0050】

「個体」または「被検者（体）」は、脊椎動物、特に哺乳類種の動物を言い、家畜、競技用動物、げっ歯類および人間を含む霊長類を含むが、これらに限定されない。

【0050】

【0051】

本明細書において使用する「と併用して」は、別の治療方法以外に1つの治療方法を行うこといい、被検者に（ポリペプチドの形態の）第VIII因子を送達し、さらに同じ被検者に本明細書に記載するrAAVを投与することなどである。同様に、「併用して」は、1つの治療方法を他の治療方法の前、最中または後に被検者に行うことを言う。

【0052】

本明細書において使用する「治療」は、有用なまたは望ましい臨床結果を得るための方法である。本発明の目的のためには、有用なまたは望ましい臨床結果には、検出可能または検出不能にかかわらず、少なくとも1つの症状の軽減、疾病の程度の減少、疾病状態の安定（すなわち、悪化しない）、疾病の拡散の防止、疾病進行の遅延または緩和、疾病状態の改善または軽減および寛解（部分的または全体的）が含まれるが、それらに限定されない。「治療」はまた、治療を行わない場合に予測される生存と比較したとき、生存を延長することを意味すること

もある。

【0053】

「生物試料」は、個体から入手される種々の試料の種類を含み、診断またはモニタリングアッセイに使用することができる。この定義は、血液および生物起源の他の液体試料、生検標本または組織培養物またはそれら由来の細胞およびそれらの子孫などの固体組織試料を含む。この定義はまた、調達後に、試薬による処理、溶解化、またはタンパク質もしくはポリヌクレオチドなどの特定成分の濃縮などの任意の方法で操作された試料も含む。「生物試料」という用語は臨床試料を含み、また培養細胞、細胞上清、細胞溶解物、血清、血漿、生体液および組織試料を含む。

【0054】

疾患を「軽減すること」は、本発明のrAAVベクターを投与しない場合と比較したとき、疾病状態の程度および/または望ましくない臨床症状が減少すること、および/または疾病進行の時間経過が緩和または遅延することを意味する。

【0055】

示すように、スペーサーDNAが本発明の構築物に含有されてもよい。「スペーサーDNA」は、タンパク質をコードせず、プロモーターまたはプロモーター因子として働かないナンセンスDNAであると意図されている。すなわち、スペーサーDNAは、第VIII因子の核酸分子を発現するために任意の空間的な必要性を提供するために使用されてもよい。スペーサーDNAのサイズまたは長さは数ヌクレオチドから数百ヌクレオチドと異なってもよい。スペーサーDNAの長さは、rAAVベクターのサイズ限界を考慮すると、発現される第VIII因子のヌクレオチド配列のサイズおよびエンハンサー因子によって制限される。

【0056】

「力価」は、流体の容量あたりの感染性ウィルス単位の数と意図されている。

【0057】

「高力価rAAVストック」は、人工的な操作を行わない生産系によって生産されるウィルス粒子のストックと意図されている。「人工的な操作を行わない」は、ウィルス粒子の数が、プール化、多数回の操作または他の濃縮手段によって操作



されていないことを意味する。本発明の目的のためには、約 $2 \times 10^7$ 細胞を含有する1枚の細胞プレートにより約 $2 \sim 3 \times 10^{11}$ 粒子が産生する。これらの数は適当にスケールアップすることができる。産生されるウィルス粒子の数のうち、1%が機能的ウィルスである。すなわち、100あたり1つが第VIII因子タンパク質を発現する。従って、調製物中の約 $2 \times 10^9$ の感染性ウィルス粒子が機能的である。これらの約90~100%がトランスジーンを発現する。

#### 【0058】

「感染単位」は、感受性のある宿主とともにおくとき検出可能な影響を生ずる最小単位と意図されている。感染単位を求めるアッセイは既知である。例えば、本発明において使用される一方法では、ウィルスをアデノウィルスおよび野生型AAVの存在下においてレポーター細胞上で複製する。複製後、DNAを細胞から入手し、第VIII因子コード配列をプロービングする。この方法では、細胞中のrAAVの数を求めることができる。

#### 【0059】

粒子の総数を測定するためには、細胞をウィルスヌクレオチド配列でプロービングすることができる。本発明の方法では、rAAV/第VIII因子は総粒子の約90~99.9%、好ましくは約99~約99.99%を含有する。野生型ウィルスは総粒子の0.01%未満である。入手したこのような99.9%の粒子のうち、100あたり1つ、すなわち、1%が機能的ウィルス、すなわち、Bドメイン欠失第VIII因子トランスジーンを発現するウィルスである。

#### 【0060】

本発明は、一部には、生物学的に活性なBドメイン欠失第VIII因子をコードするヌクレオチド配列が組み換えAAV (rAAV) ベクター中で効率的に発現されるという予測されなかった所見に基づいている。肝臓選択的 (liver-preferred) エンハンサー因子のコントロール下においてBドメイン欠失ヒト第VIII因子 (BDDヒト第VIII因子) を搬送するrAAVベクターをマウスに投与することにより、肝臓によってBドメイン欠失ヒト第VIII因子が長期間 (14ヶ月より長い) 発現され、治療後の動物の血漿中で治療レベルのBドメイン欠失ヒト第VIII因子 (正常の~27%) が発現される。従って、本発明は、遺伝子治療のためにrAAVベクターを使

用して、血友病を治療する新規試薬と方法を提供する。

【0061】

rAAVベクターは、ゲノムに異種（すなわち、外因性）遺伝子を保有するAAVウィルス粒子である。rAAVベクターは、ウィルスを形成する4679野生型塩基のうち145塩基のcis型末端重複を少なくとも1つ必要とする。他の全てのウィルス配列は重要ではなく、trans型で供給されてもよい（Muzyczka, (1992) Curr. Topics Microbiol. Immunol. 158: 97）。典型的には、rAAVベクターは、ベクターによって効率的にパッケージングされ得るトランスジーンを最大のサイズにするのに最小の末端重複配列だけを保持する。

【0062】

本明細書において使用する、AAVによる細胞の「感染」または「形質導入」は、AAVが細胞内に流入して潜伏的または活動的感染を確立することを意味する。例えば、Fields et al., Virology, Volume 2, Chapter 69 (3d ed., Lippincott-Raven Publishers) 参照。AAVを被検者に投与する本発明の実施態様では、AAVがゲノムに組み込んで、潜伏的感染を確立することが好ましい。しかし、ベクターは形質導入した細胞中ではエピソードとして安定して存続することができるので、このような組み込みはrAAVベクターによって搬送されるトランスジーンが発現には必要ない。

【0063】

特に示さない限り、本発明によるrAAVベクター、ヘルパーベクターおよび細胞を構築するために、標準的な方法を使用することができる。このような技法は当業者に既知である（例えば、Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY); Aububel et al. (1995) Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., NY) 参照）。

【0064】

[A. Bドメイン欠失第VIII因子をコードするrAAVベクター]

本発明は、rAAVベクターを使用して、効率的にパッケージングされ、送達され、発現され得る生物学的に活性なBドメイン欠失第VIII因子をコードする構築物

を提供する。ある実施態様では、rAAVベクターに含有されるAAV ITRは、プロモーターを追加しなくても、Bドメイン欠失第VIII因子ヌクレオチド配列を発現させられる。本発明のrAAVベクターは、発現を促進するために、少なくとも1つのエンハンサーと少なくとも1つのプロモーターとを含有する。本発明によるrAAV/第VIII因子ベクターは、(例えば、血液凝固を増強する、または血友病Aを治療する獣医学的用途または医学的用途のために)コードされているBドメイン欠失第VIII因子タンパク質を産生するため、または治療的投与のために、細胞および被検者への投与を可能にするのに十分な力価で作製することができる。

【0065】これらの結果は、AAVベクターの既知のパッケージング限界を考慮すると予測

されないものである。このような限界により、AAVカプシドによって効率的にパッケージングできる異種ヌクレオチド配列および/または発現制御因子のサイズが制約される(例えば、Russell et al. (1999) Blood 94: 864; Chuah et al. (1998) Critical Review in Oncology/Hematology 28: 153参照)。

【0066】全長の第VIII因子遺伝子は長さが186kbで、9029ヌクレオチドのmRNAをコード

する。全長の第VIII因子をコードするcDNAは、rAAVベクターのパッケージング能力を大幅に超えると思われる。Bドメインは第VIII因子機能に必要なことが見出されている。Bドメインをコードする配列を欠失すると、約4.4~4.6kbのcDNA Bドメイン欠失第VIII因子が生じる。AAV中での高力価産生のためにサイズ制限を越えることなく高レベル発現に十分な発現制御因子(例えば、プロモーター、エンハンサー、ポリ(A)部位)を加えなければならないので、このようなより小さい構築物でさえもrAAVベクターを使用して効率的にパッケージングおよび発現させられないことを当技術分野は教示している(Russell et al. ((1999) Blood 94: 864, 868ページのCol. 1, para. (2))。

【0067】従って、本発明が組み換えベクターの効率的なパッケージングを達成し、その

結果高力価rAAV/Bドメイン欠失第VIII因子ストックが得られたことは全く驚くべきことであった。特に、rAAVベクターが、野生型の109%であるトランスジ-

ン発現カセットを使用したことに関しては驚くべきことであった (5084bp)。さらに、このBドメイン欠失第VIII因子ベクターはインビボにおいて肝実質細胞によって長期間、高レベルで発現され、治療後の動物の血漿中に治療レベルのBドメイン欠失第VIII因子タンパク質を産生する。

#### 【0068】

示すように、本発明は、生物学的に活性なBドメイン欠失第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列を保有するrAAVベクターを提供する。Bドメイン欠失第VIII因子をコードするヌクレオチド配列は、鳥類および哺乳類の種を含む、いかなる種由来であってもよい。好ましくは、Bドメイン欠失第VIII因子は哺乳類であり（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、サル、ヒト等）、さらに好ましくは、Bドメイン欠失第VIII因子はヒトBドメイン欠失第VIII因子である。さらに別法として、Bドメイン欠失第VIII因子は、以下に記載するように種間ハイブリッドであってもよい。ヌクレオチド配列は合成配列であってもよい。Bドメイン欠失第VIII因子配列の変種および断片も、第VIII因子の生物活性を保持する限り、含まれる。

#### 【0069】

生物学的に活性なBドメイン欠失第VIII因子コード配列は、AAVによってパッケージングされ得るほど十分小さくなければならない。Bドメイン欠失第VIII因子トランスジーン構築物のサイズは約4.8kb以下であることが好ましく、さらに好ましくは約4.7kb以下であり、よりさらに好ましくは約4.6kb以下であり、よりさらに好ましくは約4.5kb以下であり、さらにより好ましくは約4.4kb以下である。

#### 【0070】

または記述されているように、Bドメイン欠失第VIII因子トランスジーンカセット（すなわち、ITRsおよび他の発現制御因子を含む）は約5.2 kb以下であることが好ましく、約5.1 kb以下であり、約5.0 kb以下であり、約4.9 kb以下であり、4.8 kb以下であり、約4.7 kb以下であり、約4.5 kb以下でありまたは約4.4 kb以下である。Bドメイン欠失第VIII因子トランスジーンカセットは、rAAVストックを作製するのに効率的にパッケージングされ得るサイズである。

【0071】 Bドメイン欠失第VIII因子構築物は、上記のサイズにするために切断

および/または欠失されてもよい。発現されるBドメイン欠失第VIII因子タンパク質が十分な生物活性（例えば、凝固）を保持する限り、当技術上既知の任意の切断および/または欠失を使用してもよい。「十分な生物活性」は、Bドメイン欠失第VIII因子がインビトロおよび/またはインビボにおいて使用されるのに十分な活性を有することを意図している。好ましくは、発現される切断および/または欠失Bドメイン欠失第VIII因子は、天然の第VIII因子タンパク質の生物活性の少なくとも約25%、約50%、約75%、約85%、約90%、約95%、約98%、約99%以上を保持する。第VIII因子の生物活性を求めるアッセイは当技術上周知であり、本明細書に記載されているようなアッセイを含む。第VIII因子の特異的活性を求めるためのワンステージ凝固アッセイ(one-stage clotting assay)の説明は、Practor and Rapaport (1961) Blood 72: 335も参照。第VIII因子活性はまた発色アッセイ(chromogenic assay)でも測定することができる (Kabi-Coatest; Kabi Vitrus, Stockholm, Sweden)。

【0072】

【0072】 好ましい実施態様において、本発明のBドメイン欠失第VIII因子構築物は、Bドメインをコードするヌクレオチド配列が欠失している。Bドメインの一部または全てをコードするヌクレオチド配列を欠失してトランスジーンサイズを最小にしてもよい。本発明の構築物は、使用したクローニング方法の結果として、Bドメイン欠失領域由来の多少のヌクレオチド配列を保持してもよい。1つのヒトBドメイン欠失第VIII因子のアミノ酸配列を本明細書の図1および配列番号2に示し、この図および配列番号1に示すヌクレオチド配列のヌクレオチド419~4835によってコードされる。Bドメイン欠失第VIII因子変異体は、残基760から1639までを欠失している（第VIII因子760~1639） (Pittman et al. (1993) Blood 11: 2925。他のBドメイン欠失第VIII因子は当技術上既知で、Gnatenko et al (1999) Br. J. Haematology 104: 27によって記載されている第VIII因子Δ756~1679および第VIII因子Δ761~1639構築物、Ill et al. (1997) Blood Coagulation and Fibrinolysis 8: 523によって記載されている第VIII因子746~1639が含まれ

る。いくつかのBドメイン欠失変異体が記載されている、米国特許第5,910,481号も参照。本発明はさらに、図6および配列番号：4に示すアミノ酸配列を有するイヌ由来の構築物を提供する。イヌBドメイン欠失第VIII因子（Bドメイン欠失イヌ第VIII因子）変異体タンパク質は図6（配列番号：3）に示すヌクレオチド配列のヌクレオチド428～4790によってコードされる。この構築物もBドメインから残基760～1639が欠失している。Bドメイン欠失ヒト第VIII因子およびBドメイン欠失イヌ第VIII因子の変種および断片も本発明に含まれる。

#### 【0073】

ある実施態様では、Bドメイン欠失第VIII因子をコードする発現カセットおよび/またはヌクレオチド配列は、例えば、Bドメイン欠失第VIII因子トランスジェンの転写および/または翻訳効率を増加するために修飾されている。このような修飾は当技術上既知で、例えば、参照として本明細書に組み入れられている、Ill et al. (1997) Blood Coagul. Fibrinolysis 8(suppl.2): S23-S30に記載されている。

#### 【0074】

本発明の他の実施態様において、生物学的に活性なBドメイン欠失第VIII因子をコードするヌクレオチド配列は、図1（配列番号1）に示すヌクレオチド約419～4835として与えられる配列または図6（配列番号：3）に示すヌクレオチド約428～4790として与えられる配列と実質的に同一であり、生物学的に活性または治療的に有効なBドメイン欠失第VIII因子をコードする。この定義は、第VIII因子遺伝子に天然の対立遺伝子変異を含むことを意図している。この実施態様によるBドメイン欠失第VIII因子は、上記の任意の種起源であっても、ハイブリッドであってもよい。本明細書において使用する、「実質的に同一である」ヌクレオチド配列は少なくとも75%同一であり、さらに好ましくは少なくとも80%、85%、90%、95%または99%以上同一であり、すなわち、それらは開示されている配列と少なくとも75%、さらに好ましくは少なくとも80%、85%、90%、95%または99%以上の同一性を共有する。配列の同一性は本明細書の別の箇所に記載されている方法によって求めることができる。

#### 【0075】

実質的に同一なヌクレオチド配列をハイブリダイゼーションさせる高度にストリンジেন্টなハイブリダイゼーション条件は当技術上周知である。例えば、相同なヌクレオチド配列を図1（配列番号1）に示すヌクレオチド約419～4835として与えられる配列または図6（配列番号：3）に示すヌクレオチド約428～4790として与えられる配列にハイブリダイゼーションするには、25%のホルムアミド、5×SSC、5×デンハルト溶液および100  $\mu$ g/mlの1本鎖DNAおよび5%の硫酸デキストラン、42℃、4、8または12時間、洗浄条件として、25%のホルムアミド、5×SSC、0.1%のSDS、42℃、15分間で、約60%の相同性の配列のハイブリダイゼーションが可能になる。さらにストリンジেন্টな条件は、0.3MのNaCl、0.03Mのクエン酸ナトリウム、0.1%のSDS、60℃または70℃の洗浄のストリンジেন্টな条件で、標準的なインサイチュアハイブリダイゼーションを使用する。Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY) 参照。

【0076】本発明は、Bドメイン欠失第VIII因子が十分な生物活性（上記）を保持する限り、Bドメイン欠失第VIII因子構築物は他の改変を含有してもよいことを理解している。例えば、Bドメイン欠失第VIII因子タンパク質は、生物活性を増強する、タンパク質の半減期を延長する、またはBドメイン欠失第VIII因子を投与するレシピエントの抗原性応答を低下するように改変することができる（例えば、引用することによりその内容全体が本明細書の一部をなすものとする、Kaufman et al. (1998) Haemophilia 4: 370参照）。さらに別法として、Bドメイン欠失第VIII因子は種間ハイブリッドであってもよい。例えば、第VIII因子のヒト/ブタハイブリッドは米国特許第5,583,209号（引用することによりその開示内容全体が本明細書の一部をなすものとする）に記載されている。同様に、第V因子と第VIII因子のドメイン交換により、半減期が延長され、および/または生物活性が増加したハイブリッドが作製される。

#### 【0077】

関心のある自然または天然型のタンパク質またはポリペプチドの生物学的に活性で好適な変種は、そのポリペプチドの断片、類似体および誘導体であってもよ

い。「断片」は、無傷のポリペプチド配列および構造の一部だけからなるポリペプチドを意図しており、自然のポリペプチドのC末端欠失またはN末端欠失であってもよい。「類似体」は、1つ以上のアミノ酸の置換、挿入または欠失を有する自然のポリペプチド配列および構造を有する場合には、自然のポリペプチドまたは自然のポリペプチドの断片の類似体を意図している。「誘導體」は、自然のタンパク質またはポリペプチドの望ましい生物活性が保持される限り、関心のある自然のタンパク質もしくはポリペプチド、自然のタンパク質もしくはポリペプチドの断片またはそれぞれの類似体の、グリコシル化、リン酸化またはその他の外因的部分の追加などの任意の好適な修飾を意図している。このような断片、類似体および誘導體を作製する方法は一般に当技術上利用可能である。

#### 【0078】

例えば、タンパク質またはポリペプチドのアミノ酸配列変種は、関心のある自然のタンパク質またはポリペプチドをコードするクローニングされたDNA配列の突然変異によって作製することができる。突然変異およびヌクレオチド配列改変の方法は当技術上周知である。例えば、引用することにより本明細書の一部をなすものとする、Walker and Gastra eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, New York); Kunkel (1985) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 82: 488-492; Kunkel et al. (1987) *Methods Enzymol.* 154: 367-382; Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, NY); 米国特許第4,873,192号; およびそこに引用されている参考文献参照。関心のあるポリペプチドの生物活性に影響を与えない適当なアミノ酸置換に関するガイダンスは、引用することにより本明細書の一部をなすものとする、*Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D. C.) においてDayhoff et al. (1978) のモデルに見出すことができる。1つのアミノ酸を同様の特性を有する別のアミノ酸と交換するなどの同類置換が好ましい。同類置換の例には、GlyとAlaの置換、ValとIleとLeuの間の置換、AspとGluの置換、LysとArgの置換、AsnとGlnの置換およびPheとTrpとTyrの間の置換が含まれるが、それらに限定されない。

#### 【0079】



関心のあるタンパク質またはポリペプチドの変種を構築する際には、変種が常に望ましい活性を有するように改変をする。明らかに、変種のタンパク質またはポリペプチドをコードするDNAに加えられる改変は、配列をリーディングフレームの外側に置いてはだめで、好ましくは、二次的なmRNA構造を作製すると思われる相補的な領域を作製しない。欧州特許出願番号第75,444号参照。

【0080】本発明のタンパク質またはポリペプチド変種は、

関心のあるタンパク質またはポリペプチドの生物学的に活性な変種は、比較の基準として働く基準ポリペプチド分子のアミノ酸配列と、一般に、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは約90%～95%以上、最も好ましくは約98%以上アミノ酸配列が同一である。関心のある自然のポリペプチドの生物学的に活性な変種は、自然のポリペプチドと1～15アミノ酸程度、6～10アミノ酸のように1～10アミノ酸程度、5アミノ酸程度、4、3、2または1アミノ酸残基程度が異なってもよい。「配列の同一性」は、変種のアミノ酸配列の具体的な連続セグメントを整列させて、基準分子のアミノ酸配列と比較するとき、変種のタンパク質またはポリペプチドと基準として働くタンパク質またはポリペプチド分子との間に同じアミノ酸残基が見出されることを意図している。2つのアミノ酸配列間の配列の同一性の割合は、両方の配列に同じアミノ酸残基がある位置の数を求めて一致する位置の数を出し、一致する位置の数を基準分子と比較しているセグメントの総位置数で割り、その結果に100をかけて配列の同一性の割合を出すことによって算出する。

【0081】2つの配列を最適に並置するために、変種のアミノ酸配列の連続セグメントに

基準分子のアミノ酸配列と比較して、アミノ酸残基を追加またはアミノ酸残基を欠失することができる。基準のアミノ酸配列との比較に使用する連続セグメントは少なくとも20連続するアミノ酸残基を含み、30、40、50、100以上の残基であってもよい。変種のアミノ酸配列にギャップを挿入することにより配列の同一性を増加する補正はギャップペナルティをあてがうことによって行うことができる。配列を並置する方法は、アミノ酸配列およびアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列においても当技術上周知である。

## 【0082】

このように、任意の2つの配列間の同一性の割合を求めることは、数学アルゴリズムを使用して実施できる。配列を比較するために使用される、1つの好ましく、非限定的な数学アルゴリズムの例はMyers and Miller (1988) CABIOS 4: 11-17である。このようなアルゴリズムは、GCG配列並置ソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム (バージョン2.0) で使用される。アミノ酸配列を比較するとき、PAM120ウェイト残基表、ギャップ長ペナルティ12およびギャップペナルティ4をALIGNプログラムに使用することができる。2つの配列を比較する際に使用する、別の好ましく非限定的な数学アルゴリズムの例はKarlin and Altschul (1990) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87: 2264のアルゴリズムに、Karlin and Altschul (1993) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 5873-5877のように改良を加えたものである。このようなアルゴリズムを、Altshul et al (1990) J. Mol. Biol. 215: 403のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込む。BLASTヌクレオチド検索は、NBLASTプログラム、スコア=100、ワード長=12を使用して実施することができる、関心のあるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列と相同なヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索は、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3を使用して実施することができる、関心のあるポリペプチドに相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較目的のギャップアラインメントを得るためには、Altshul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389に記載されているように、Gapped BLASTを使用することができる。または、PSI-Blastを使用して、分子間の遠い関係(distant relationship)を検出する反復検索を実施することができる。Altshul et al. (1997) 上記。BLAST、Gapped BLASTおよびPSI-Blastプログラムを使用するとき、それぞれのプログラムのデフォルトパラメーター (例えば、XBLASTおよびNBLAST) を使用することができる。http://www.ncbi.nlm.nih.gov参照。また、ALIGNプログラム (Atlas of Protein Sequence and Structure 5: Suppl. 3のDayhoff (1978) (National Biomedical Research Foundation, Washington, D. C.) およびWisconsin Sequence Analysis Package, Version 8のプログラム (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin製)、例えば、プログラムのデフォルトパラメーターを使用するGAPプログラ

ムも参照。

【0083】

アミノ酸配列の同一性の割合を考慮するとき、いくつかのアミノ酸残基位置が同類アミノ酸置換の結果として異なることがあるが、これはタンパク質機能の特性に影響を与えない。これらの例では、配列の同一性の割合は、同類置換されたアミノ酸の類似性を説明する方向に調節することができる。このような調節は当技術上周知である。例えば、Myers and Miller (1988) Computer Applic. Biol. Sci. 4: 11-17参照。

【0084】

当業者は、種々の発現制御因子（例えば、プロモーターおよび/または転写因子結合部位および/またはエンハンサー）に、望ましいレベルおよび組織選択的(tissue-preferred)発現に応じて、Bドメイン欠失第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列が作動可能に結合することを理解している。上記のように、一般に、発現制御因子は少なくとも1つのエンハンサー因子を含有する。しかし、プロモーターまたはプロモーター因子もカセットに含有されてもよいことが認識されている。

【0085】

プロモーターまたはプロモーター因子の選択は一部にはサイズに基づいている。AAVベクターによるパッケージサイズの制約のために、小型または微小なプロモーターが好ましい。

【0086】

上記のサイズの制約が満たされるなら、種々のプロモーターを本発明のrAAVベクターに使用することができる。これらには、単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼまたはチミジル酸シンターゼプロモーター(Merrill (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 4987, Deng et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9: 4079)、B型肝炎ウィルスコアプロモーター（例えば、Kramvis and Kew (1999) J. Viral. Hepat. 6: 415-427）、ヒトU1 snRNA プロモーター（例えば、Asselbergs and Pronk (1993) Mol. Biol. Rep. 17: 101-114）、近接的要素を有するマウス最小アルブミンプロモーター（例えば、Pinkert et al., (1987) Genes Dev. 1: 268-2

76参照)、PCT公報国際公開公報第09920773号(参照として本明細書に組み入れられている)に記載されているプロモーター、最小サイトメガロウィルス主要即時型プロモーター、初期および後期SV40プロモーター、アデノウィルス主要後期プロモーター、 $\alpha$ -または $\beta$ -インターフェロンプロモーター、現象または組織選択的(tissue preferred)プロモーター等が含まれるが、それらに限定されない。プロモーターは、適宜、強力に発現させるようにまたは比較的弱い発現を生ずるように選択することができる。

#### 【0087】

一実施態様において、本発明のrAAVベクターは、現象特異的なプロモーターの活性化時に、Bドメイン欠失第VIII因子核酸分子がコードする関心のある遺伝子が発現されるように、肝臓選択的(liver-preferred)エンハンサー因子および現象特異的なプロモーターの転写コントロール下においてBドメイン欠失第VIII因子コード配列を含有する。本明細書において使用する「現象特異的なプロモーター」は、ある種の細胞条件下において活性化されるプロモーターである。プロモーターからの転写を活性化してBドメイン欠失第VIII因子を主に発現して、血流中に分泌することができる因子を含有し、迅速に増殖している(造血細胞などの)細胞中で主に転写が活性であるチミジンキナーゼもしくはチミジル酸シンターゼプロモーターまたはトランスフェリン受容体プロモーターなどの細胞増殖によって活性化される(または、細胞周期依存的な)プロモーター、細胞がウィルスに感染された場合に活性化される、 $\alpha$ または $\beta$ インターフェロンプロモーターなどのプロモーター(Fan and Maniatis (1989) EMBO J 8: 101; Goodbourn et al. (1986) Cell 45: 601)並びにホルモンの存在によって活性化される、エストロゲン応答プロモーターのようなプロモーターを含むが、これらに限定されない、数多くの現象特異的なプロモーターを本発明に関連して使用することができる。Toohey et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6: 4526参照。

#### 【0088】

別の実施態様において、本発明のrAAVは、肝臓選択的(liver-preferred)プロモーターの活性化時に、Bドメイン欠失第VIII因子が発現されるように、肝臓選択的(liver-preferred)エンハンサーおよび肝臓選択的(liver-preferred)プロ

モーターの転写コントロール下においてBドメイン欠失第VIII因子遺伝子を含有する。このような肝臓選択的 (liver-preferred) プロモーターの代表例には、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (「PEPCK」) (Hatzoglou et al. (1988) J. Biol. Chem. 263: 17798; Benvenisty et al. (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 1118; Vaulont et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 6: 4409) アルコール脱水素酵素プロモーター (Felder (1989) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86: 5903) およびアルブミンプロモーターおよびアルファ胎児タンパク質 (Feuerman et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9: 4204; Camper and Tilghman (1989) Genes Develop. 3: 537) が含まれるが、それらに限定されない。

【0089】本発明はまた、特定の転写因子のための結合部位であるプロモーター因子をrAAVベクターが含有する実施態様を含む。これらのプロモーター因子は本明細書では「転写因子結合部位」と言われる。これらの部位に結合する転写因子は遍在的であっても、組織選択的 (tissue-preferred) であってもよい。遍在的な転写因子のための結合部位の非限定的な例には、TFIIDに結合するTATA box (TATAAAA)、CTF/NFに結合するCAAT box (GGCCAATCT)、SP1に結合するGC box (GGGCGG) およびATFに結合するATF box (GTGACGT) が挙げられる。組織選択的 (tissue-preferred) 転写因子結合部位の非限定的な例には、C/EBPタンパク質のための肝臓選択的 (liver-preferred) CAAT box結合部位 (最適なパリンδροームGATTGCGCAATC、配列番号1: 5に記載)、HNF1、HNF3およびHNF4の結合部位 (例えば、Costa and Grayson (1991) Nucleic Acids Res. 19: 4139-4145) 並びにTGT3の結合部位 (例えば、Chiang et al. (1992) Biochim. Biophys. Acta 1132: 337-339) が挙げられる。

#### 【0090】

本発明のある実施態様では、発現制御因子は、コトランスジェンの肝臓選択的 (liver-preferred) 発現のためのエンハンサーを含有する。本発明が含むこのようなエンハンサーの非限定的な例には、 $\alpha$ 1ミクログロブリン/ビクニンエンハンサー (例えば、Rouet et al. (1992) J. Biol. Chem. 267: 20765-20773)、B型肝炎ウイルスEnhI (図1または配列番号1のヌクレオチド150~278並びにGuo et al. (1991) J. Virol. 65: 6686-6692) およびEnhII (Gustin et al. (1993) Virolog

y 193(2): 653-60) エンハンサー、ヒトアルブミンE<sub>1</sub>, エンハンサーおよびヒトアルブミンE<sub>2</sub> エンハンサー (Hayashi et al. (1992) J. Biol. Chem. 267: 14580-14585) 並びにヒトサイトメガロウィルス即時型遺伝子エンハンサー (Boshart et al. (1985) Cell 41: 521-530) が挙げられる。

#### 【0091】

当技術上既知のいかなる発現制御因子も使用することができるが、当業者は、使用する発現制御因子は、好ましくは、AAVベクターについて記載したサイズの制約を満たすことを理解している。

#### 【0092】

また、本発明のrAAVベクターは、標的細胞に送達される異種ヌクレオチド配列が作動可能に結合しているポリアデニル化シグナルを含有してもよい。これらのポリアデニル化配列は、好ましくは、上記のサイズの制約に適合する。好ましいポリアデニル化は約100bp未満を含有する。一実施態様において、ポリアデニル化シグナルは合成ポリアデニル化シグナルである（例えば、引用することにより本明細書の一部をなすものとする、国際公開公報第09929773号参照）。

#### 【0093】

本発明の一実施態様において、Bドメイン欠失第VIII因子トランスジーンカセットを図1（配列番号1）に示す。この構築物は、左側および右側AAV末端反復配列と、5'側から3'側方向に、B型肝炎ウィルスEnhIエンハンサー (nt 150-278)、スパーサー配列 (nt 279-399)、Bドメイン欠失第VIII因子コード領域 (nt 419-4835) およびTKポリアデニル化配列 (nt 4840-4914) を含有する。

#### 【0094】

##### [B. rAAVストックを作製する方法]

遺伝子治療に使用するrAAVウィルス調製物には少なくとも3つの望ましい特徴がある。最初に、rAAVウィルスは、効果的な割合の細胞を標的組織に形質導入するのに十分に高い力価で作製されることが好ましい。インビボにおける遺伝子治療には、典型的には、大多数のrAAV感染単位が必要である。例えば、約10<sup>8</sup> 粒子、約10<sup>9</sup> 粒子、約10<sup>10</sup> 粒子、約10<sup>11</sup> 粒子、約10<sup>12</sup> 粒子、約10<sup>13</sup> 粒子、約10<sup>14</sup> 粒子、約10<sup>15</sup> 粒子の過剰量を必要とする治療もある。第二に、rAAVウィルス調製物は

、本質的に、複製能力AAV(すなわち、ヘルパーウイルスまたはヘルパーウイルス機能の存在下において複製できる表現型が野生型のAAV)を含有しないことが好ましい。第三に、遺伝子導入に関連する免疫応答を生ずるいかなるリスクも最小または排除するために、rAAVウイルス調製物は全体として、他のウイルス(AAV作製に使用するヘルパーウイルスなど)並びにヘルパーウイルスおよび細胞タンパク質並びに脂質および炭水化物などの他の成分を本質的に含有しないことが好ましい。AAVは、AAV作製過程中に効果的に複製、パッケージングされるためには、ヘルパーウイルス(典型的には、アデノウイルス)または他のヘルパーウイルス機能を与えることによる同時感染を必要とする「ヘルパー依存的」ウイルスであり、さらに上記のように、アデノウイルスは遺伝子導入用途に関して宿主免疫応答を形成することが観察されているので、この後者の点は、AAVに関しては本質的に重要である(例えば、Le et al. (1997); Byrnes, et al. (1995) *Neuroscience* 66: 1015; McCoy et al. (1995) *Human Gene Therapy* 6: 1553およびBarr et al. (1995) *Gene Therapy* 2: 151参照)。本発明は、本質的に、

【0095】本発明は、rAAVベクターを複製し、パッケージングするために、損失している機能は、種々の損失しているrepおよび/またはcap遺伝子産物に必要な機能を一体としてコードするパッケージング遺伝子または複数のパッケージング遺伝子が補う。パッケージング遺伝子または遺伝子カセットには、好ましくは、AAV ITRsが隣接せず、好ましくは、rAAVゲノムといかなる実質的な相同性も持たない。

【0096】本発明は、rAAVベクター構築物および相補的なパッケージング遺伝子構築物は本発明において数多くの異なる形態で作成することができる。ウイルス粒子、プラスミド、安定に形質転換された宿主細胞は全て、このような構築物をパッケージング細胞に一時的または安定に導入するために使用することができる。

【0097】本発明は、種々の異なる遺伝的に改変された細胞を本発明に関連して使用することができる。例として、哺乳類宿主細胞を、安定に組み込まれたrAAVベクターの少なくとも無傷のコピーとともに使用することができる。複製機能を供給するために、プ

ロモーターに作動可能に結合したAAV rep遺伝子を少なくとも含有するAAVパッケージングプラスミドを使用することができる（米国特許第5,658,776号に記載）。または、複製機能を供給するために、AAV rep遺伝子がプロモーターに作動可能に結合した安定な哺乳類細胞を使用することができる（例えば、Trempe et al., 米国特許第5,837,484号;Burststein et al., 国際公開公報第98/27207号およびJohnson et al., 米国特許第5,658,785号参照）。上記の封入化タンパク質を提供する、AAV cap遺伝子をAAV rep遺伝子と共にまたは別個に提供することができる（例えば、上記出願および特許並びにAllen et al.（国際公開公報第96/17947号参照）。他の組み合わせも可能である。

#### 【0098】

当技術上記載され、上記の参照文献および以下の実施例において例示されているように、このような細胞を形質転換または形質導入する種々の手段のいずれかを使用して、遺伝材料を（rAAVを作製するための哺乳類「プロデューサー」細胞などの）細胞に導入することができる。例として、このような技法には、細菌プラスミドのトランスフェクション、ウィルスベクターの感染、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降および種々の脂質系組成物のいずれかを使用した導入（「リポフェクションと言われることが多い方法）が含まれるが、それらに限定されない。これらの技法を実施する方法および組成物は当技術上記載されており、広範に使用されている。

#### 【0099】

好適に改変された細胞の選択は、当技術の任意の技法によって実施することができる。例えば、細胞を改変するために使用するポリヌクレオチド配列を、当技術上既知の1つ以上の検出または選択マーカーと同時に組み込んでもよく、またはそれに作動可能に結合してもよい。例として、薬物耐性遺伝子を選択マーカーとして使用することができる。次いで、薬物耐性細胞を採取し、増殖し、望ましい配列の発現（すなわち、異種ポリヌクレオチドの作製）について試験することができる。組み込んだポリヌクレオチドの獲得、局在化および/または維持についての試験は、DNAハイブリダイゼーションに基づいた技法（当技術上既知のサザンブロット手法および他の手法など）を使用して実施することができる。発現



の試験は、遺伝的に改変した細胞から抽出したRNAのノーザン分析によってまた、  
 は対応する遺伝産物の間接的な免疫蛍光によって実施することができる。パッケ  
 ーシング能力および効率の試験および確認は、AAVの残りの機能的成分およびヘ  
 ルパーウィルスを経細胞に導入して、AAV粒子の産生について試験することによ  
 って得ることができる。細胞が複数のポリヌクレオチド構築物で遺伝的に改変され  
 ている場合には、それらを別個に細胞に導入して、各段階を順次実証することが  
 一般により便利である（が、必須ではない）。このような技法を記載している参  
 照文献には本明細書に引用されているものが含まれる。

#### 【0100】

第1の方法は、rAAVベクターをAAV粒子にパッケージングする方法では、rAAVベクター配列（  
 すなわち、AAV-ITRsが隣接する配列）とtrans型で提供されるAAVパッケージング  
 遺伝子を別個の細菌プラスミド形態で宿主細胞に導入する。この方法の例はRats  
 chin et al. (1984) Mol. Cell. Biol. 4:2072; Hermonat et al. (1984) Proc.  
 Nat. Acad. Sci. USA 81: 6466; Tratschin et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5  
 :3251; McLaughlin et al. (1988) J. Virol. 62: 1963; Lebkowski et al. (1988)  
 Mol. Cell. Biol. 7: 349; Samulski et al. (1989) J. Virol. 63: 3822-3828  
 およびFlotte et al. (1992) Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 7: 349に記載  
 されている。

#### 【0101】

第2の方法は、rAAVベクター配列またはAAVパッケージング遺伝子どちらかを  
 エピソームプラスミドの形態でAAV複製に使用する哺乳類細胞に提供すること  
 である。例えば、米国特許第5,173,414号参照。

#### 【0102】

第3の方法は、rAAVベクター配列またはAAVパッケージング遺伝子のどちらかま  
 たは両方を複製に使用する哺乳類細胞のゲノムに安定に組み込むことである。

#### 【0103】

この第3の方法の1つの例示的な技法は国際特許出願国際公開公報第95/13365号  
 (Targeted Genetics Corporation and Johns Hopkins University) および対応  
 する米国特許第5,658,776号 (Flotte et al.による) に概略が記載されている。

この例は、安定に組み込まれたrAAVベクターの少なくとも1つの無傷のコピーを有し、ベクターは標的ポリヌクレオチドに作動可能に結合したAAV ITRおよび転写プロモーターを含有するが、repの発現はこの細胞内では制限されている哺乳類細胞を使用している。好ましい実施態様において、異種プロモーターに作動可能に結合したrep遺伝子を含有するAAVパッケージングプラスミドを細胞に導入し、粒子中でのrAAVベクター配列の複製およびパッケージングを可能にする条件下においてその細胞を培養する。

#### 【0104】

別の方法はTrempe et al., 米国特許第5,837,484号に概略が記載されている。この例は、機能的Repタンパク質を発現することができるように、AAV rep遺伝子が異種プロモーターに作動可能に結合した安定な哺乳類細胞株を使用している。種々の好ましい実施態様において、AAV cap遺伝子は安定に提供されてもよく、または一時的に（例えば、プラスミドに）導入されてもよい。rAAVベクターも安定または一時的に導入することができる。

#### 【0105】

別の方法は、特許出願国際公開公報第96/17947号 (Targeted Genetics Corporation)に概略が記載されている。この例は、ヘルパーウィルス誘導性異種プロモーターに作動可能に結合され、安定に組み込まれたAAV cap遺伝子および安定に組み込まれたAAV rep遺伝子を含有する哺乳類細胞を使用している。rAAVベクター配列を含有するプラスミドも細胞に（安定にまたは一時的に）導入される。次いで、ヘルパーウィルスを導入することによって、rAAVベクターの粒子へのパッケージングが開始される。

#### 【0106】

混在するウィルスおよび/またはウィルスまたは細胞タンパク質を実質的に含有しない高力価のrAAVウィルス調製物を得る方法はAtkinson et al.によって国際公開公報第99/11764号に記載されている。そこに記載されている技法をrAAV粒子調製物の大規模作製に使用することができる。

#### 【0107】

これらの種々の例は、十分に高い力価のrAAVウィルス粒子を作製する問題、rA

AVベクターとパッケージング成分をコードする配列との組み換えを最小にする問題、哺乳類の細胞株におけるAAV rep遺伝子の発現に関連して生ずる可能性のある困難の軽減または回避の問題（Repタンパク質はそれら自身の発現を制限するだけでなく、細胞の代謝にも影響を与えるので）、混在するウィルスおよび/またはウィルスまたは細胞タンパク質を実質的に含有しないrAAVウィルス調製物を作製する問題に対処している。

#### 【0108】 ヘルパーウィルスを用いたAAVベクターの増殖

AAVベクターのウィルス粒子へのパッケージングは、AAVの好適なヘルパーウィルスが存在することまたはヘルパーウィルス機能が提供されることを利用している。AAV複製を支持することができるヘルパーウィルスはアデノウィルスによって例示されるが、（HSV1、サイトメガロウィルスおよびHHV-6を含むが、これらに限定されない）ヘルペスウィルスおよびボックスウィルス（特にワクシニア）などの他のウィルスを含む。このような任意のウィルスを使用することができる。

#### 【0109】 ヘルパーウィルスを用いたAAVベクターの増殖と包装

ヘルパーウィルスは、目的の宿主細胞に感染することができる型およびサブグループのアデノウィルスであることが多い。サブグループCのヒトアデノウィルス、特に血清型1、2、3、4、5、6および7が通常使用される。血清型5は、一般に、好ましい。

#### 【0110】 アデノウィルスを用いたAAVベクターの増殖と包装

アデノウィルスの特徴および増殖パターンは当技術上既知である。例えば、"Fundamental Virology", Fields et al., eds.のHorowitz, "Adenoviridae and their replication", pp771-816を参照。パッケージングされたアデノウィルスゲノムは鎖状のDNA分子で、アデノウィルスITRsを介して左側および右側末端の末端タンパク質複合体を介して結合して、環を形成する。早期、中間および後期成分のコントロールおよびコード領域はゲノム内で重複する。早期領域遺伝子はアデノウィルスゲノムを複製する際に必要であり、それらの位置により、E1、E2、E3およびE4領域に分類される。

#### 【0111】

本質的ではないが、原則的に、ヘルパーウイルス株は、最終的に遺伝子治療を受ける被検者において複製が欠失していることが望ましい。従って、rAAVウイルス調製物に存在するいかなる残存ヘルパーウイルスも複製無能である。E1AまたはE1AおよびE3領域が除去されているアデノウイルスはほとんどのヒト細胞に感染しない。それらは、欠損している活性を補うことができる許容細胞株（例えば、ヒト293細胞株）において複製できる。ヘルパー機能に関連すると思われるアデノウイルス領域および関連すると思われる領域は当技術上同定されており、記載されている（例えば、P. Colosi et al., 国際公開公報第97/17458号およびそこに引用されている参考文献参照）。

#### 【0112】

例えば、Atkinson et al. (国際公開公報第99/11764号) に記載されているように、ヘルパーウイルス活性を提供するために、「条件付き感受性」ヘルパーウイルスも使用することができる。このようなヘルパーウイルス株は、効率的なゲノム複製を受けない少なくとも1つの条件下において、宿主細胞のAAV複製を支持することができる特性を最小限持っていなければならない。ヘルパーウイルス活性が無傷のウイルス粒子として供給される場合には、第2の条件下においてウイルスが宿主細胞において複製できることも一般に必要である。第1の条件は、必要な補助因子（陽イオンなど）の有無、阻害剤の有無または温度などの環境条件の変化などの容易にコントロール可能な特徴が第2の条件と異なる。最も便利なことには、2つの条件の差は温度であり、このような条件付き感受性ウイルスは温度感受性ヘルパーウイルスと言われる。

#### 【0113】

ヘルパーウイルスは、ウイルスの複製が許容されるいかなる細胞においても作製することができる。アデノウイルスでは、好ましい細胞には293細胞およびHeLa細胞が含まれる。播種密度の増加を可能にする培養技法を使用することが好ましい。懸濁培養に適合されている293細胞およびHeLa細胞変種を利用することができる。HeLaは懸濁状態での細胞増殖、生存度および形態の理由のために好ましい。これらの細胞は、複製速度の低い温度感受性アデノウイルス株を作製するのに十分な密度（1mlあたり $2 \times 10^6$ ）で増殖することができる。確立されたら、細

細胞にウイルスを感染し、許容温度において十分な期間、一般に3～7日、典型的には、約5日間培養する。

#### 【0114】

ヘルパーウイルスの作製、単離および濃縮に有用な方法の例はAtkinson et al. (国際公開公報第99/11764号) 見出すことができる。

#### 【0115】

いくつかの基準は、本明細書に記載するrAAV粒子を生産する際に使用する細胞の選択に影響を与える。最初の問題として、選択されるヘルパーウイルスを使用する場合には、細胞はrAAVベクターの複製およびパッケージングを許容する必要がある。しかし、ほとんどの哺乳類細胞はAAVが増殖的に感染し、多数の細胞はアデノウイルスなどのヘルパーウイルスによっても感染されることがあるので、多岐にわたる哺乳類細胞および細胞株がこれらの基準を実際に満足することは明らかである。これらのうち、より好ましい細胞および細胞株は、rAAVウイルス複製の大規模生産を容易にするほど容易に培養で増殖することができるものである。しかしまた、多数のこのような細胞がこの基準を実際に満足する。大規模生産が望ましい場合には、生産方法の選択も宿主細胞の選択に影響する。例えば、Atkinson et al. (国際公開公報第99/11764号) にさらに詳細に記載されているように、いくつかの生産技法および培養容器またはチャンバーは付着または接着細胞を増殖するために設計されているが、懸濁細胞培養に設計されているものもある。後者の場合では、宿主細胞は、好ましくは、懸濁内容に適合されるかまたは適合可能である。しかし、付着または固定依存的と考えられている細胞または細胞株の場合でも、懸濁培養できる細胞を連続的に選択することによって、固定依存的な親系統の懸濁適合性変種を誘導することができる。例えば、Atkinson et al. (国際公開公報第99/11764号) 参照。

#### 【0116】

最後に、複製およびパッケージングに必要なヘルパーウイルス、rAAVベクター配列および全てのAAV配列が同じ細胞に存在する必要がある。1つ以上のAAVパッケージング遺伝子がベクターとは別個に提供される場合には、(i) 各AAVパッケージング遺伝子がAAV複製または封入化タンパク質をコードする1つ以上のAAVパッ

ケーシング遺伝子と、(ii)少なくとも1つのAAV ITRが隣接した異種ポリヌクレオチドを含有し、AAVパッケージング遺伝子が欠失しているrAAVベクターを使用して、宿主細胞に導入される異種ポリヌクレオチドおよび(iii)ヘルパーウィルスまたは必要なヘルパーウィルス機能をコードする配列を含有する宿主細胞が提供される。しかし、これらの因子の1つ以上が1つのレプリコン上で組み合わされてもよいことが注目されるべきである。

#### 【0117】

ヘルパーウィルスは、好ましくは、培養細胞のほとんどのに感染するのに十分なレベルが細胞培養物に導入されるが、得られる調製物中に存在するヘルパーウィルスの量を制限するために、最小にしておいてもよい。1-100の感染効率または「MOI」を使用することができるが、5-10のMOIが典型的には十分である。

#### 【0118】

同様に、rAAVベクターおよび/またはパッケージング遺伝子がパッケージング細胞に一時的に導入される場合には（安定して導入される場合と異なり）、それらは、好ましくは、培養細胞のほとんどを遺伝的に改変するのに十分なレベルが導入される。一般に必要な量は、細菌プラスミドとして供給される場合には、 $10^6$ 細胞あたり $10\mu\text{g}$ 程度であり、AAV粒子として供給される場合には、 $10^5$ 細胞あたり $10^8$ 粒子程度である。最適な量は、当業者の範囲内である通常の力価検定を実行することによって決定される。

#### 【0119】

これらの要素は、同時にまたは任意の順序で連続的に細胞に導入することができる。細胞が要素のいずれかによって遺伝的に改変される場合には、次の要素を導入する前に、細胞を選択して、増殖させることができる。

#### 【0120】

好ましい例において、常在rAAVベクターを救済し、パッケージングするためにヘルパーウィルスを最後に細胞に導入する。細胞は、一般に、必要な程度までAAVパッケージング遺伝子がすでに補われている。好ましくは、rAAVベクターまたはパッケージング遺伝子、さらに好ましくは、両者が安定に細胞に導入されている。他の組み合わせが可能であることが容易に理解される。このような組み合わ

せは本発明の範囲内に含まれる。

#### 【0121】

宿主細胞に必要な要素が提供されたら、rAAVベクターの複製およびパッケージングを可能にするために、AAVの複製が許容される条件下において細胞を培養する。培養時間は、好ましくは、ピーク作製レベルに相当するように調節され、典型的には、3～6日である。次いで、rAAV粒子を回収し、それらを作製するために使用した細胞から単離する。

#### 【0122】

必要に応じて、rAAV粒子を濃縮、ヘルパーウィルス粒子を欠失または被検者に投与するのに好適にするようにrAAVウィルス調製物をさらに処理することができる。例示的な技法はAtkinson et al.を参照（国際公開公報第99/11764号）。精製技法には、密度勾配遠心分離およびクロマトグラフィー技法が含まれてもよい。感染性ヘルパーウィルス活性の低下には、当技術上既知の過熱処理またはpH処理による不活性化を含んでもよい。他の処理には、濃縮、ろ過、ダイアフィльтраーションまたは好適な緩衝液もしくは製薬学的担体との混合を含んでもよい。抗原量および遺伝子量の均一性、並びに混在するヘルパーウィルスの相対的な割合などの、バッチの本質的な特徴を保持する単位用量および多容量型分布量に調製物を分割することができる。

#### 【0123】

ウィルス調製物の感染力価を求める種々の方法は当業者に既知である。例えば、力価を求める1つの方法は、Atkinson et al.（国際公開公報第99/11764号）に提供されている高スループット力価アッセイである。この迅速で、定量的な方法によって求められるウィルス力価は、さらに古典的な技法によって求められる力価と密に対応している。しかしまた、この高スループット方法は多数のウィルス複製反応を同時に処理し、分析することができるので、例えば、ウィルスの複製および感染が許容される細胞株または許容されない細胞株のスクリーニングを含む、多数の他の用途がある。

#### 【0124】

感染性アデノウィルスによりヘルパー機能を提供するのに好ましい方法は、効

率的なAAV作製に必要なヘルパー遺伝子の全てを保有する非感染性アデノウィルスミニプラスミドを使用する (Ferrari et al. (1997) Nature Med. 3: 1295; Xiao et al. (1998) J. Virology 72: 2224)。アデノウィルスミニプラスミドで得られるrAAV力価は、野生型アデノウィルス感染の従来の方法で得られるものより40倍高い(Xiao et al. (1998) J. Virology 72: 2224)。この方法は、アデノウィルスとの同時トランスフェクションを実施する必要性を明らかにしている (Holscher et al. (1994) J. Virology 68: 7169; Clark et al. (1995) Hum. Gene Ther. 6: 1329; Trempe and Yang (1993), in, Fifth Parvovirus Workshop (Crystal River, FL)。

#### 【0125】

複製能力AAVの作製を妨害するために別個の発現カセット上でrepおよびcap遺伝子を分割する方法 (Allen et al. (1997) J. Virol. 71: 6816) およびパッケージ細胞株を使用する方法 (Gao et al. (1998) Human Gene Therapy 9: 2353; Inoue et al. (1998) J. Virol. 72: 7024) を含むが、これらに限定されない、rAAVストックを作製する他の方法が記載されている。

#### 【0126】

本発明は、本発明のBドメイン欠失第VIII因子トランスジーンおよびBドメイン欠失第VIII因子発現カセットを保有する高力価rAAVベクターストックを作製する方法を提供する。rAAV/第VIII因子を作製する以前の試みは、インビボにおいて投与するのに十分な力価のウィルスを作製できなかったもので、これらの結果は驚くべきである。

#### 【0127】

高力価rAAV/Bドメイン欠失第VIII因子ストックを作製する本発明の方法は、上記のように、Bドメイン欠失第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列を保有するrAAVベクターをパッケージング細胞に感染することを含む。rAAVベクターはパッケージング細胞によって複製、パッケージングされ、rAAV粒子を回収してAAVストックを形成する。このストックは、1ミリリッターあたり少なくとも約 $10^4$ 、約 $10^5$ 、約 $10^6$ 、約 $10^7$ 、約 $10^8$ 、約 $10^9$ 、約 $10^{10}$ 、約 $10^{11}$ 、約 $10^{12}$ または約 $10^{13}$ 粒子の力価を有する。



【0128】本発明のrAAVパッケージング細胞は、例えば、

rAAVストックを作製するのに好ましいパッケージング細胞は当業者に既知であり、293細胞（例えば、Samulski et al. (1989) J. Virology 63: 3822; Ferrarini et al. (1997) Nature Med. 3: 1295; Xiao et al. (1998) J. Virology 72: 2224参照）を含むが、これらに限定されない、アデノウィルスヘルパーウィルスまたはアデノウィルスミニプラスミドを含む方法によってrAAVを作製するパッケージング細胞を含む。他のrAAVパッケージング細胞には、Gao et al. (1998) Human Gene Therapy 9: 2353およびInoue et al. (1998) J. Virol. 72: 7024によって記載されているものを含む。

【0129】

【0129】本発明のrAAVパッケージング細胞は、例えば、

【C】遺伝子導入技術】本発明の方法は、インビトロ（例えば、第VIII因子タンパク質を作製するまたはエクスピボにおける遺伝子治療のため）およびインビボにおいて分裂細胞および非分裂細胞を含む、広域的な宿主細胞に異種ヌクレオチド配列を送達する手段を提供する。本発明のベクター、方法および製薬学的組成物は、必要としている被検者にタンパク質もしくはペプチドを投与する方法または治療方法等に有用である。この方法では、該タンパク質またはペプチドは被検者においてインビボで作製される。被検者はこのタンパク質またはペプチドに欠陥があるので、または被検者におけるこのタンパク質またはペプチドの産生は、治療方法等としておよび以下に詳細に説明するように、多少の治療効果を与えることができるので、被検者は該タンパク質またはペプチドを必要としていてもよい。

【0130】本発明のrAAVパッケージング細胞は、例えば、

一般に、本発明は上記のrAAVベクターによってパッケージングすることができるBドメイン欠失第VIII因子をコードする任意の異種核酸を送達するために使用することができる。Bドメイン欠失第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列は、治療効果を得るために、被検者に投与することができる。例えば、Bドメイン欠失第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列は、血液凝固を増強（例えば、改善、増大、増加）するために投与することができる。

【0131】

#### [D. 被検者、製薬学的組成物、ワクチンおよび投与方法]

本発明は、獣医学的用途および医学的用途における用途を見出している。好適な被検者は鳥類および哺乳類を含み、哺乳類が好ましい。本明細書において使用する「鳥類」という用語には、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、ウズラ、七面鳥およびキジが含まれるが、それらに限定されない。本明細書において使用する「哺乳類」という用語には、ヒト、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ネコ、イヌ、ウサギ等が含まれるが、それらに限定されない。ヒト被検者が最も好ましい。ヒト被検者には新生児、幼児、少年少女および成人が含まれる。

#### 【0132】

特定の実施態様において、本発明は、製薬学的に許容されうる担体または他の医薬品、薬剤、担体、補助剤、希釈剤等中に本発明のrAAV粒子を含有する医薬製剤を提供する。注射用は、担体が典型的には、液体である。他の投与方法用には、担体は、発熱物質不含滅菌水または発熱物質不含滅菌リン酸緩衝生理食塩液など、固体であっても、液体であってもよい。吸入投与方法用には、担体は呼吸可能であり、好ましくは、固体または液体の粒子形態である。注射媒体として、安定剤、塩または生理食塩液および/または緩衝液などの、注射溶液に慣例である添加剤を含有する水を使用することが好ましい。

#### 【0133】

「製薬学的に許容されうる」は、生物学的およびその他の望ましくないことのない材料を意図している。すなわち、材料はいかなる望ましくない生物作用を生ずることなく、ウィルスベクターと共に被検者に投与することができる。従って、このような製薬学的組成物は、例えば、半ピボで細胞をトランスフェクションする際または被検者にウィルス粒子を直接投与する際に使用することができる。

#### 【0134】

本発明は、Bドメイン欠失第VIII因子をコードする異種ヌクレオチド配列を細胞に送達する方法をさらに提供する。インビトロでの方法では、ウィルスは、当技術上周知の標準的なウィルス形質導入方法によって細胞に投与することができる。好ましくは、ウィルス粒子は、特定の標的細胞に適当な標準的な形質導入方法により、適当な感染効率で細胞に加えられる。投与するウィルスの力価は、標

的細胞の種類および特定のウィルスベクターにより異なってもよく、不当な実験を行うことなく、当業者が求めることができる。または、本発明のrAAVベクターの投与は、当技術上既知のいかなる任意の他の手段によって実施することができる。

【0135】 本発明のウィルスベクターを投与する細胞は、神経細胞（抹消および中枢神経系の細胞、特に脳細胞を含む）、網膜細胞、上皮細胞（例えば、腸および呼吸器）、筋肉細胞、膵臓細胞（島細胞を含む）、肝細胞、心筋細胞、骨細胞（例えば、骨髄幹細胞）、造血幹細胞、脾細胞、線維芽細胞、内皮細胞、生殖細胞等を含むが、これらに限定されない、いかなる種類であってもよい。さらに、細胞は、上記のように、いかなる種起源であってもよい。

【0136】 本発明の特定の態様において、細胞を被検者から取り出し、rAAVベクターを細胞に導入し、次いで細胞を被検者に戻す。半ピボで治療するために被検者から細胞を取り出し、次に被検者に戻す方法は当業者に既知である。または、Bドメイン欠失第VIII因子を発現する別の被検者由来の細胞または培養細胞にrAAVベクターを導入し、第VIII因子治療を必要としている被検者に細胞を投与する。半ピボ遺伝子治療に好適な細胞には、肝細胞、神経細胞（中枢および末梢神経系の細胞、特に脳細胞を含む）、膵臓細胞、脾細胞、線維芽細胞（例えば、皮膚線維芽細胞）、ケラチン細胞、内皮細胞、上皮細胞、筋原細胞、造血幹細胞および骨髄間質細胞が含まれるが、それらに限定されない。

【0137】 本発明のさらに別の態様は、本発明のウィルス粒子でインピボにおいて被検者を治療する方法である。必要としている被検者または動物への本発明のrAAV粒子の投与は、ウィルスベクターを投与する当業者に既知の任意の手段によることができる。本明細書において使用する「治療的に有効な」量は、第VIII因子欠失に関連する症状（例えば、血液凝固）の少なくとも1つを軽減（例えば、緩和、減少、低下）するのに十分であるrAAV/Bドメイン欠失第VIII因子ベクターの量である。Bドメイン欠失第VIII因子を投与する利点はその不利益を上回る限り、B

ドメイン欠失第VIII因子の投与が第VIII因子欠失症状をなくす必要はない。

【0138】

ヒト血漿中の第VIII因子の正常範囲は約100～200ng/mlである。正常の5%程度の血漿第VIII因子濃度で正常の血液凝固が見られる。正常血漿第VIII因子濃度の1%でも治療効果を観察することができる (Nilsson et al. (1992) J. Int. Med. 232: 25-32; Lpfgvist et al. (1997) J. Int. Med. 241: 395-400; Petrini et al. (1991) Am. J. Ped. Hem. Onc. 13: 280-287およびHematology-Principles and Practice, 3rd ed. (2000) Hoffman, R: ed., 1884-1885ページ)。本発明のrAAV/Bドメイン欠失第VIII因子ベクターを被検者に投与することにより、好ましくは、血漿第VIII因子濃度は正常な第VIII因子濃度の少なくとも約1%となり、さらに好ましくは正常の少なくとも約5%になり、よりさらに好ましくは正常の少なくとも約10%になり、なおさらに好ましくは正常の少なくとも約20%になり、なおよりさらに好ましくは正常の少なくとも約25%になる。

【0139】

本発明の特に好ましい実施態様において、関心のあるヌクレオチド配列は被検者の肝臓に送達される。肝臓への投与は、静脈内投与、門脈内投与、胆嚢内投与、動脈内投与および肝実質細胞への直接注射を含むが、これらに限定されない当技術上既知の任意の方法によって実施できる。

【0140】

従って、本発明のさらに別の態様は、血友病Aを含む、第VIII因子欠陥患者を治療する方法である。本明細書において使用する、第VIII因子欠陥は欠陥のあるタンパク質またはタンパク質の欠失による。好ましくは、被検者はヒト被検者である。本発明の方法によると、被検者は、生物学的に有効な量の第VIII因子を産生するのに十分な量のrAAV/第VIII因子ベクターを1つ以上の組織に投与される。好ましくは、組織は脳、脾臓、脾臓、肝臓、細網内皮系 (RES)、リンパ系または筋肉または骨髄/間質細胞であり、最も好ましくは、肝臓である。

【0141】

好ましい実施態様において、rAAVベクターは肝臓に投与される。好ましくは、細胞 (例えば、肝細胞) はrAAV/Bドメイン欠失第VIII因子ベクターに感染され

ヒトBドメイン欠失第VIII因子タンパク質を発現し、上記に規定した治療的に有効な量のタンパク質を循環系に分泌する。第VIII因子を投与する利点はその不利益を上回る限り、第VIII因子欠失症状をなくす必要はない。

【0142】 本発明は、ヒトBドメイン欠失第VIII因子タンパク質を投与することに関する。

例示的な投与様式には、経口、直腸、経粘膜、局所、経皮、吸入、非経口（例えば、静脈内、皮下、皮内、筋肉内および関節内）投与等並びに組織または器官への直接注射、または気管内（intratrahecal）、直接的な筋肉内、心室内、静脈内、腹腔内、鼻腔内または眼内注射が挙げられる。注射剤は、溶液剤または懸濁剤、注射時に溶液剤または懸濁剤に調製するのに好適な固形剤、または乳剤として、従来の形態で製剤化することができる。または、例えば、デポ剤または徐放性製剤の形態で、全身ではなく局所的にウィルスを投与することができる。

#### 【0143】

好ましい実施態様において、本発明のrAAVは、静脈内投与によって投与され、さらに好ましくは、静脈内投与によって肝臓に投与される（以下に記載）。

【0144】 本発明は、ヒトBドメイン欠失第VIII因子タンパク質を投与することに関する。

用量は、投与様式、治療対象の疾病または状態の重症度、患者個人の状態、特定のウィルスベクターおよび送達される遺伝子、および被検者の種、被検者のサイズおよび体重に依存し、通常の方法で設定できる。循環系において治療的に有効な量を達成する例示的な用量は、産生されるトランスジーンレベル、タンパク質の活性等に応じて、約 $10^8$ 、約 $10^9$ 、約 $10^{10}$ 、約 $10^{11}$ 、約 $10^{12}$ 、約 $10^{13}$ 、約 $10^{14}$ 、約 $10^{15}$ 感染単位である。

【0145】 本発明は、ヒトBドメイン欠失第VIII因子タンパク質を投与することに関する。

本発明は、例示のみの目的で本明細書に含まれ、本発明を制限する意図のない実施例を参照して本明細書において例示される。

#### 【0146】

##### [実施例1：ベクターの構築]

ヒトBドメイン欠失第VIII因子または強化緑色蛍光タンパク質（EGFP）を発現するrAAVプラスミドを構築した。簡単に説明すると、pmt2LA（Pittman et al. (1993) Blood 81:2925; Dr. D. Pittman, Genetics Institute, Cambridge,

MAにより提供されたものである)をPCRで増幅して、Bドメイン欠失第VIII因子の全長の配列をコードする4435 bpの断片を作製した。4435 bpのBドメイン欠失第VIII因子を、B型肝炎ウィルスのスパーサー配列(pDLZ2)またはエンハンサーI(EnhI)およびスパーサー配列(pDLZ6)(Guo et al. (1991) J. Virology 65:6686)を含有するカセットに挿入した。pDLZ6の配列は、Bドメイン欠失第VIII因子タンパク質のアミノ酸配列(配列番号2にも示す)と共に図1(配列番号1)に示す。最初の19アミノ酸残基はシグナルペプチドであり、Bドメイン欠失ヒト第VIII因子前駆体が小胞体内に転位する前に切断される。pDLZ6中のBドメイン欠失ヒト第VIII因子をpTR-EGFP(R.Haberman, UNC Gene Therapy Center, Chapel Hill, NC)のEGFP cDNAと交換して、pDLZ8を構築した。構築物は全てTkポリ阿德ニル化シグナルを使用し、pAAV/cFIXの AAV ITRs を使用して隣接した。

#### 【0147】

pDLZ6構築物は、図1(および配列番号1)のヌクレオチド(nt)位置約1~146および4916~5084の2つのITRs、ヌクレオチド位置約150~278のB型肝炎ウィルスEnhIエンハンサー因子、ヌクレオチド位置約279~399のスパーサー配列、ヌクレオチド位置約419~4835のBドメイン欠失ヒト第VIII因子cDNA並びにヌクレオチド位置約4804~4914のTkポリA配列を含有する。

#### 【0148】

##### [実施例2：細胞および培養]

293、HeLaおよびHepG2細胞を、10%ウシ胎仔血清(FBS, Gibco/BRL, Gaithersburg, MD)を加えたダルベッコ変法イーグル培地(DMEM, Gibco/BRL, Gaithersburg, MD)中で、抗生物質(ペニシリンおよびストレプトマイシン)を加えた場合または加えない場合でにおいて、37℃、5%のCO<sub>2</sub>において、培養した。FBSは55℃において30分間不活性化した。これらの条件下では、第VIII因子タンパク質および活性はFBS中では検出されなかった。

#### 【0149】

##### [実施例3：rAAV作製および精製]

3つのプラスミドトランスフェクションスキームを使用してrAAVを作製した。簡単に説明すると、リン酸カルシウム沈降法を使用して、低密度分布状態の293

細胞にrAAVベクタープラスミド、AAVヘルパープラスミドpXX2 (Xiao et al. (1998) J. Virology 72:2224)およびアデノウイルスヘルパープラスミドpXX6を同時トランスフェクションした。トランスフェクションの48時間後、細胞を回収し、凍結融解を3回反復して溶菌し、超音波処理して、rAAVビリオン粒子を遊離させた。硫酸アンモニウム沈降後、ウィルス粒子を精製し、セシウム密度勾配遠心分離を2回実施して濃縮した。ドット-ブロットでウィルス粒子を力価検定し、rAAV/ヒト第VIII因子ピーク濃度勾配分画を集めし、リン酸緩衝生理食塩液(PBS)で透析して、 $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。

【0150】 実施例3：ヒト第VIII因子のインビトロにおける発現

【実施例4：Bドメイン欠失ヒト第VIII因子のインビトロにおける発現】

2×10<sup>5</sup>の293またはHepG2細胞を6ウェルプレートの各プレートでプレート培養した。24時間のプレート培養後、アデノウイルス(MOI=1)が存在する場合または存在しない場合において、rAAVウィルス粒子/細胞(MOI=10)を加えて1時間おいて細胞を形質導入した。細胞培養培地を分析するために回収し、感染後24時間ごとに新鮮な培地と交換した。ヒト第VIII因子発現および機能をアッセイするために使用した全ての培地について、第VIII因子を含有しないかどうかをスクリーニングした。

【0151】 実施例5：ヒト第VIII因子のタンパク質機能および阻害剤の活性

【実施例5：ヒト第VIII因子のタンパク質機能および阻害剤の活性】

rAAV由来ヒト第VIII因子タンパク質を酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA、簡単には、モノクローナルヒツジ抗-ヒト第VIII因子抗体)(Affinity Biological, Inc., Canada)で検出して、捕獲抗体として使用した。ペルオキシダーゼ接合ヒツジ抗-ヒト第VIII因子抗体(Affinity Biological, Inc., Canada)を二次抗体として使用した。プールした正常なヒト血漿の連続希釈液から作成した標準曲線により第VIII因子レベルを算出した(UCRP, Fisher Scientific)。ヒト第VIII因子のELISAによる再現性のある感度は0.3ng/mlであった。

【0152】 実施例6：ヒト第VIII因子の機能

rAAV由来Bドメイン欠失第VIII因子の機能を活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)およびCoatest(Chromgenix AB, Sweden)で試験した。FIX欠陥血漿(Paci

fic Hemostasis)ではなく第VIII因子欠陥血漿を使用したことを除いて、APTTを実施した。Coatestは、製造業者の指示に従って実施した。プールした正常なヒト血漿の連続希釈液を使用して、第VIII因子活性の標準曲線を作成した。

#### 【0153】

Bethesda阻害剤アッセイ(BIA)を使用して、マウス血清中の抗-ヒト第VIII因子阻害剤を検出した(Kasper et al. (1975) *Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica* 34:612)。簡単に説明すると、マウス血漿を55℃において30分間インキュベーションして、内因性マウス第VIII因子を不活性化した。次いで、処理したマウス血漿の連続希釈液に等容量の正常なヒトプール血漿を混合し(UCRP, Fisher Scientific)、37℃において2時間インキュベーションした。APTTを実施して、不活性化したマウス血漿と共にインキュベーションしたUCRP中の残存第VIII因子活性を求めた。抗-ヒト第VIII因子阻害剤の力価は、確立したBIA標準曲線により、各試料の残存第VIII因子活性から算出した。

#### 【0154】

##### 【実施例6：動物の世話および処理手法】

マウスは、UNC Institutional Animal Care and Use Committeeのガイドラインに準拠して、チャペルヒルのノースカリフォルニア大学の動物施設で飼育した。各動物の体重を計測し、ウィルスを投与する前に、ケタミン(100mg/kg)とキシラニン(5mg/kg)の混合物を使用して鎮静化した。切開用顕微鏡下において、1cmの垂直正中線腹部切開を実施した。 $2 \times 10^{10}$ または $2 \times 10^{11}$ の粒子のrAAV/DLZ6またはrAAV/DLZ8をリン酸緩衝生理食塩液(PBS)に加えたものをHarvard Apparatusポンプ22を使用して、門脈を介して2~5分かけて肝臓に注射した。眼窩後方静脈叢を介して血液を採取し、血漿を-80℃で保存した。注射の30週後に処理した3匹のマウスについて組織学およびDNA/RNA分析を実施するために組織/器官を採取した。採取した組織には、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、心臓、脳、脊髄、腸、筋肉、リンパ節および骨髄が含まれる。組織は、処理する前に、-80℃で凍結する(DNAおよびRNAを単離するため)か、または10%の中性緩衝ホルマリンで終夜固定した。

#### 【0155】



### 【実施例7：DNAの単離および分析】

高分子量ゲノムおよび低分子量DNA(Hirt)を単離し、ノーザンブロットおよびDNA Southern blottingに使用した。プラスミドpDLZ6の29.5pg、5.9pg、1.18pg、0.118pgおよび0.0118pgを、対照マウス肝臓の20 $\mu$ gのゲノムDNAに添加し、マウス肝細胞あたり、それぞれ、5、1、0.2、0.02および0.01コピーのrAAV/DLZ6に相当するコピー数標準を作成した。各ITRの内側でプラスミドpDLZ6を切断して、4.6kbのDLZ6ゲノムを遊離する制限酵素SphIでゲノムDNAを消化して、次いでアガロースゲルで分離した。ブロットに<sup>32</sup>P-標識ヒト第VIII因子プローブをハイブリダイゼーションした。Southern blottingの結果、マウス肝臓のゲノムDNAにrAAV/DLZ6の整合領域が検出された。【0156】 Southern blottingの結果、マウス肝臓のゲノムDNAにrAAV/DLZ6の整合領域が検出された。PCRプライマー（5'-AACCTTTACCCGGTTCGTCG-3'）およびアンチセンスプライマー（5'-GTCTTTTGTACACGACTGAGG-3'）を使用して、450bpのrAAV/DLZ6ベクターユニーク断片を増幅した。PCR条件は、95℃、5分、次に95℃、2分、50℃、1分、72℃、1分を1サイクルとして30サイクルとした。

【0157】 Southern blottingの結果、マウス肝臓のゲノムDNAにrAAV/DLZ6の整合領域が検出された。

### 【実施例8：RNA抽出、ノーザンブロットおよび逆転写（RT）PCR】

マウス肝臓培養細胞または凍結したマウス組織から抽出した総細胞RNAを同様にノーザンブロットまたはRT-PCRに使用した。センスプライマー（5'-TTCTCCCAATCCAGCTGG-3'）およびアンチセンスプライマー（5'-GAGTTATTCCCGTTGATGG-3'）を使用して、534bpのユニークヒト第VIII因子cDNA断片を増幅した。PCR条件は95℃、2分、次に95℃、1分、55℃、1分、72℃、1分を1サイクルとして30サイクルとした。βアクチンプライマーペアを、記載した各試料のRT-PCRの内部対照として使用した。

【0158】

### 【実施例9：組織学的分析】

ホルマリン固定した組織をアルコール脱水して、パラフィン包埋した。組織を各々6 $\mu$ mの厚さに切片化して、キシレン中で脱パラフィンし、特級(graded)エタノールで再度水和し、さらにヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)で染色した。

【0159】

## [実施例10：rAAV Bドメイン欠失ヒト第VIII因子のパッケージング]

Bドメイン欠失ヒト第VIII因子、pDLZ2およびpDLZ6（図2）を発現する2つのrAAVベクターを構築して、B型肝炎ウイルスEnhIエンハンサー因子の利用性を試験した。トリプルプラスミドトランスフェクションおよび塩化セシウム密度勾配遠心分離を使用して、1ミリリッターあたり $10^{11}$ を超えるrAAV/DLZ6 またはrAAV/DLZ2粒子が産生された。rAAVビリオンの複製を確認するために、HeLaまたはHepG2細胞にrAAV（MOI=10）およびアデノウイルス5型（MOI=1）を形質導入した後、低分子量ウイルスDNAを単離した。図3に示すように、トランスジーンに特異的なプローブを使用して、予測されるモノマーおよびダイマー複製型のrAAV/DLZ6およびrAAV/DLZ2を検出した。rAAV/DLZ6ビリオンDNAの単離は、予測されたモノマーサイズがパッケージングされたことを確認するものである（図3）。形質導入後、EnhI配列を含有するrAAV/DLZ6は、エンハンサー因子を欠失するrAAVと比較して、HeLaおよびHepG2のmRNA転写物が30倍増加した（データは示していない）。

## 【0160】

これらの結果に基づいて、本発明者らは、pDLZ6由来のベクターを使用して第VIII因子機能的アッセイを実施した。ヒト第VIII因子タンパク質の発現は、トランスフェクションおよび形質導入から24時間経過時に採取した細胞培養培地の第VIII因子タンパク質をELISA測定することによって実施した。機能的ヒト第VIII因子の評価は、APTTおよびCoatestアッセイを使用して実施した（表1）。従って、組み換えウイルスは、野生型よりサイズが大きいのにもかかわらず、効率的にパッケージングされ、機能的Bドメイン欠失ヒト第VIII因子を産生した。これらの結果に基づいて、rAAV/DLZ6をインビボ分析に使用した。

## 【0161】

## 【表1】

## AAVベクター由来のB-ドメイン欠失ヒト第VIII因子のインビトロ発現

	抗原アッセイ	機能	アッセイ
	ELISA	APTT	Coatest
トランスフェクション	5.6ng/ml	25%	28mu/ml
形質導入	15ng/ml	40%	72mu/ml

$1 \times 10^6$  の293細胞にMOI=10のrAAV/DLZ6またはrAAV/DLZ8 (EGFP)を形質導入した。ヒト第VIII因子アッセイでは24時間経過時に培地を採取した。培地オーバーレイ293/EGFPを対照として使用した。UCRPは標準として使用し、200ng/mlのヒト第VIII因子抗原および1000 mu/mlのCoatest活性に相当する。APTTは正常な第VIII因子活性に対する割合をいう。結果は3回の実験の平均として表し、各実験は3本セットで実施した。

【0162】次に、Bドメイン欠失ヒト第VIII因子の長期発現について、[実施例1-1:マウスにおけるヒト第VIII因子の長期発現]に示すように、rAAV/DLZ6を4週齢の雄マウスまたは6週齢のNOD/scidマウスの門脈に注射した。2週間ごとに眼窩後方静脈叢を介して血液試料を採取した。Bドメイン欠失ヒト第VIII因子タンパク質は、AAVの注射から4週間後まで、 $2 \times 10^{10}$  のrAAV/DLZ6を投与した2匹のマウスの血漿中には検出されなかった。ヒト第VIII因子レベルは、一旦検出されると、正常なヒトレベルの第VIII因子レベル(200ng/ml)の2~3%が11ヶ月以上も維持された。一方、平均42ng/mlのBドメイン欠失ヒト第VIII因子、すなわち正常なヒト第VIII因子レベルの21%が注射の1週間後に $2 \times 10^{10}$  のrAAV/DLZ6を投与した4匹のマウスの血漿中で検出された(図4、パネルA)。抗-ヒト第VIII因子阻害剤力価は、注射から9~12週間後に最大力価に増加した。阻害剤の出現は、Bドメイン欠失ヒト第VIII因子血漿タンパク質の低下と一致していた。予測されるように、EGFPトランスジーンを発現するrAAVを投与した対照マウスの血漿では、Bドメイン欠失ヒト第VIII因子または抗-ヒト第VIII因子阻害剤のどちらも検出されなかった(データは示していない)。

## 【0163】

Bドメイン欠失ヒト第VIII因子タンパク質の発現を十分に評価するために、免

疫無能NOD/scidマウスに $1.5 \times 10^4$ のウィルスを門脈注射により投与した。ELISAによって測定したBドメイン欠失ヒト第VIII因子の血漿レベルは、注射後10日目に35ng/ml(正常レベルの17%)に達し、55ng/ml(正常レベルの27%)まで増加した(図4、パネルB)。予測されるように、Bドメイン欠失ヒト第VIII因子は、非感染(mock infected)scidマウスの血漿では検出されなかった(データは示していない)。

#### 【0164】

##### [実施例12：rAAVベクターの分布および組織学的分析]

rAAVベクターを投与したマウスを注射後30週めに処理した。全身投与後、抹消血、肝臓、脾臓、リンパ節、腎臓、腸、精巣、皮膚、筋肉、心臓、肺、大動脈、骨髄、脳および脊髄を分析して、ベクターの分布を測定した。ベクターDLZ6に特異的なプライマーペアを使用したDNA PCRは450bpの産物を増幅した。ベクターゲノムは、門脈注射後30週では肝臓試料からだけ検出された(図5、パネルA)。RT-PCRは、Bドメイン欠失ヒト第VIII因子cDNAの534bpの断片を増幅するプライマーペアを使用した。肝臓から単離されたRNAだけが適当なPCR産物を作製し、これはDNA PCRの結果を確認するものである(図5、パネルB)。250bpの $\beta$ アクチン断片の増幅をRT/PCRの内部対照として使用し、無傷で等しい量のRNAを示し、RT-PCRにおいて各試料に使用した(データは示していない)。DNA PCRおよびサザンブロット分析を使用することによって、1細胞あたり推定0.05コピーのrAAV/DLZ6ゲノムが、 $2 \times 10^4$ のrAAV粒子を投与した動物において形質導入後30週めに存在した(図5、パネルA&C)。この結果は、以前の報告((Snyder et al. (1999) Nature Medicine 5:64; Xiao et al. (1998) J. Virology 72:10222)と一致している。肝臓、脾臓、消化管、生殖腺、脳、心臓および肺に大きな異常は観察されなかった(データは示していない)。

#### 【0165】

##### [実施例13：肝細胞におけるrAAVの分子分析]

30週めの処理時に、低分子量DNA(Hirt DNA)および高分子量ゲノムDNAをrAAV/DLZ6を投与したマウスのいくつかの器官から単離した。各ITRの内側で切断する制限酵素SphIおよびサザンブロット法を使用して、再配列されていないrAAV/DLZ

6ゲノムを高分子量分画においてのみ検出した(図5、パネルC)。約0.05ベクターゲノムコピー/細胞が高分子量DNA分画で検出された。DNA PCRは、rAAV/DLZ6ベクターゲノムシグナルはHirt DNA分画には検出されないことを確認している(データは示していない)。PCRアッセイの感度は0.001コピー/細胞である。

【0166】

[実施例14: 第VIII因子ノックアウトマウスにおける表現型の矯正]

第VIII因子をコードする遺伝子が相同組み換えによって「ノックアウト」されており、従って血友病Aに対応する表現型を生じているマウスにrAAV/DLZ6を投与した。先の実施例に記載するように、マウスに $2 \times 10^8$ もしくは $2 \times 10^{11}$ 粒子のrAAV/DLZ6または対照ベクターを投与した。

【0167】

Bドメイン欠失ヒト第VIII因子の肝臓での発現を先の実施例に記載するように測定した。また、Bドメイン欠失ヒト第VIII因子の血漿レベルを、上記のように、経時的にモニターした。第VIII因子活性の機能的アッセイ(例えば、Coatest)も実施して、血漿中の機能的Bドメイン欠失ヒト第VIII因子タンパク質を測定した。rAAV/DLZ6処理したマウスを、Bドメイン欠失ヒト第VIII因子の発現による表現型の変化、すなわち、血友病に関連する表現型特徴の改善または矯正、(例えば、凝固時間の改善)について経時的にモニターした。

【0168】

このように、rAAVベクターを使用したBドメイン欠失ヒト第VIII因子の長期肝臓発現(実施例11)は血友病動物における表現型の改善に関連している。

【0169】

[実施例15: 血友病のイヌにおける表現型の矯正]

血友病のイヌにBドメイン欠失イヌ第VIII因子(イヌ第VIII因子)を保有するrAAVベクターを投与する。Bドメイン欠失イヌ第VIII因子発現カセットは、本質的に、ヒト第VIII因子発現カセットについての実施例1に記載されており、隣接するAAV ITRs、EnhIエンハンサー、非コード領域およびTkポリ(A)配列を含有する。プラスミドpDLZ10はイヌ第VIII因子発現カセットをコードする。pDLZ10のヌクレオチド配列は、それがコードするBドメイン欠失イヌ第VIII因子のアミノ酸

配列と共に図6に示す。この構築物は、図1（配列番号1）のヌクレオチド（nt）位置約1～144および4885～5048の2つのITRs、nt位置約149～278のB型肝炎ウイルスEnhIエンハンサー、nt位置約279～399のスペーサー配列、nt位置約428～4790のBBDイヌ第VIII因子cDNAおよびnt位置約4804～4884のポリA配列を含有する。イヌに $10^{13}$ もしくは $10^{14}$ 粒子のrAAV/イヌ第VIII因子または対照ベクターを門脈を介して注入した。同じ検討または別の検討において、同じ力価のrAAVベクターを直接肝血管注射によって投与する。

#### 【0170】

Bドメイン欠失イヌ第VIII因子の肝臓での発現を先の実施例に記載するように測定する。また、Bドメイン欠失イヌ第VIII因子および第VIII因子阻害剤の血漿レベルを上記のように経時的にモニターする。第VIII因子活性の機能的アッセイ（例えば、Coatest）も実施して、血漿中の機能的Bドメイン欠失イヌ第VIII因子タンパク質の発現を測定する。rAAV/Bドメイン欠失イヌ第VIII因子処理したイヌを、Bドメイン欠失イヌ第VIII因子の発現による表現型の変化、すなわち、血友病に関連する表現型特徴の改善または矯正、（例えば、凝固時間の改善）について経時的にモニターした。

#### 【0171】

このように、rAAVベクターを使用した、Bドメイン欠失イヌ第VIII因子の血友病イヌの肝臓への送達は血友病Aの治療のために評価される。

#### 【0172】

【実施例16：rAAV/Bドメイン欠失第VIII因子の安定なプロデューサー細胞株の作製】

一般に、rAAVプロデューサー細胞株は、細胞にベクタープラスミドをトランスフェクションし、次に抗生物質（典型的には、G418、ヒグロマイシンまたはヒスチジノール）で選択し、個々のコロニーをクローニングすることによって作製される。最初に、コロニーをベクターの複製についてスクリーニングする。次いで、アデノウィルス感染後にベクターの高レベル複製を示すクローンを感染性ベクターの作製について試験する。プラスミドBドメイン欠失第VIII因子（30 $\mu$ g）をHela C12パッケージング細胞株にエレクトロポレーション（Potter et al., 1984

、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7161-7165) によってトランスフェクションした。C12細胞株は、アデノウィルスヘルパーの感染による誘導時まで転写が静止状態にあるAAV2 repおよびcap遺伝子を含有する (Clark et al., 1995; Clark et al., 1996, Gene Therapy 3:1124-1132)。トランスフェクションの24時間後に、細胞をトリプシン処理し、プレートあたり  $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$  の細胞の密度で100mmのプレートで再度培養した。10%ウシ胎仔血清および  $300 \mu\text{g/ml}$  のヒグロマイシンBを含有するDMEM中で細胞を選択した。Atkinson et al., 1998, Nucleic Acid Res. 26:2821-2823に記載されているように、薬物耐性細胞クローンを単離、増殖し、感染性AAV第VIII因子ベクターを産生する能力を試験し、比較した。このようなプロデューサー細胞クローン (C12-55) をさらにベクター作製にさらに使用した。作製、精製および滴定は、本質的に、本明細書およびAtkinson et al., (国際公開公報第99/11764号)に記載されているように実施した。

【0173】本発明のAAV第VIII因子ベクターは、本明細書に記載されている。

本明細書に記載されている全ての文献および特許出願は、本発明が属する当技術の当業者のレベルを暗示している。全ての文献および特許出願は、個々の文献または特許出願各々が参照として組み入れられていることを具体的および個別に暗示しているのと同じ程度に参照として本明細書に組み入れられている。

【0174】本発明のAAV第VIII因子ベクターは、本明細書に記載されている。

上記の発明は、理解を明らかにするために、例示および実施例により幾分詳細に記載されているが、ある種の変更および改良が添付の請求の範囲内で実施できることが明らかである。

【図面の簡単な説明】本明細書に添付されている図面は、本発明の例示的な実施例を示す。

【図1】本明細書に添付されている図1は、本発明の例示的な実施例を示す。

本明細書に添付されている図1は、ヒトBドメイン欠失第VIII因子をコードするプラスミドpDLZ6の配列を提供する。この配列は配列番号1にも記載されている。発現カセットは、左側および右側AAV逆方向反復塩基配列 (ITR;ヌクレオチド約1~146と4916~5084)、B型肝炎ウィルスEnhIエンハンサー (ヌクレオチド約150~278)、スペーサー配列 (ヌクレオチド約279~399)、ヒトBドメイン欠失第VIII因子 (ヌクレオチド約419~4835) およびTKポリ (A) 配列 (ヌクレオチド約4840~4914) を含有する。ヌクレオチ

ド419～4835（配列番号2）によってコードされるヒトBドメイン欠失第VIII因子のアミノ酸配列も示す。

【図2】

rAAV/Bドメイン欠失第VIII因子構築物の略図である。Bドメイン欠失ヒト第VIII因子を発現する2つのrAAV構築物、pDLZ2（2つのITRsを含有する4965 bp、wt-AAVの107%）およびpDLZ6（2つのITRsを含有する5089 bp、wt-AAVの109%）のマップを示す。ITRはAAV逆方向反復塩基配列であり、EnhIはHBVのエンハンサーIであり、NCSはスペーサー配列であり、P(A)はTKポリアデニル化配列である。

【図3】

rAAV/Bドメイン欠失ヒト第VIII因子の複製およびパッケージングを示す。低分子量DNA（Hirt DNA）をrAAV/DLZ2、DLZ6およびDLZ8（対照）形質導入HeLaおよびHepG2細胞から単離し、アガロースゲルで分離し、Bドメイン欠失ヒト第VIII因子cDNAでプロービングした。左から右に、対照レーン：1-HepG2+rAAV/DLZ8、2-HeLa+rAAV/DLZ8、DLZ2：1-HeLa+rAAV/DLZ2、2-HepG2+rAAV/DLZ2、DLZ6：1-HeLa+rAAV/DLZ6、2-HepG2+rAAV/DLZ6および未被覆rAAV/DLZ6ビリオンDNA。

【図4】

マウスにおけるrAAV/Bドメイン欠失ヒト第VIII因子のインビボにおける発現を示すグラフである。精製rAAV/DLZ6ウィルスを門脈経路でマウスに投与した。ELISAを利用して、血漿中のヒト第VIII因子レベルを測定し、BIAを利用して、抗-ヒト第VIII因子阻害剤力価を測定した。パネルAは、 $2 \times 10^{11}$ のrAAV/DLZ6を投与したマウス（ $n=4$ ）の血漿中のBドメイン欠失ヒト第VIII因子抗原レベルおよび抗-ヒト第VIII因子阻害剤力価である。パネルBは、 $1.5 \times 10^{11}$ のrAAV/DLZ6を投与したNOD/scidマウス（ $n=4$ ）のBドメイン欠失ヒト第VIII因子抗原測定値である。実線は、ヒト第VIII因子抗原レベルで、破線は抗-Bドメイン欠失ヒト第VIII因子阻害剤力価である。

【図5】

rAAV/DLZ6を注射したマウスの分子分析を示す。パネルAは、PCRのために設計したプライマーの図である。パネルBは、門脈注射によるマウスのrAAVベクター分布をしめすDNA PCRの結果である。rAAV/DLZ6特有の450bpの断片をDNA



PCRで増幅して、肝注射後のrAAV分布を試験した。ネガティブコントロールは、対照マウスの肝臓DNAである。DNA試料は、高用量のrAAV/DLZ6を投与したマウスの脳、脊髄、筋肉、骨髓、心臓、肺、精巣、リンパ節、腎臓、腸、脾臓である。肝臓/LDは、低用量のrAAV/DLZ6を投与したマウスの肝臓DNAである。肝臓HDは、高用量のrAAV/DLZ6を投与したマウスの肝臓DNAである。標準曲線、細胞あたり、それぞれ、5、1、0.2、0.1、0.01および0ゲノムコピー当量のプラスミドpDLZ6を有する対照マウス肝臓のゲノムDNA。パネルCは、RT/PCRのために設計したプライマーの図である。パネルDは、対照動物および実験動物から単離した総RNAのRT-PCR分析である。534bpのBドメイン欠失ヒト第VIII因子特異的断片を増幅するためにプライマーを設計した。RT対照は、高用量のrAAV/DLZ6を投与したマウス肝臓から単離したRNAを使用した。陰性対照は、対照動物から単離したRNAを使用した。筋肉、脳、リンパ節、精巣、腎臓および脾臓のRNA試料は、高用量のrAAV/DLZ6を投与したマウス由来であった。LDは、低用量のAAV/DLZ6を投与したマウスから単離した肝臓RNAであり、HDは、高用量のAAV/DLZ6を投与したマウスから単離した肝臓RNAである。パネルEは、Sph Iを使用した制限切断の図である。パネルFは、実験動物から単離した高分子量ゲノムDNAとHirt DNAのサザンブロット分析である。標準曲線：細胞あたり、それぞれ、5、1、0.2および0.02ゲノムコピー当量のプラスミドpDLZ6を有する対照マウス肝臓のゲノムDNAである。HMWゲノムDNAおよび低分子量wt肝DNAは、高用量rAAV/DLZ6を投与した動物から単離した。

#### 【図6】

イヌBドメイン欠失第VIII因子をコードするプラスミドpDLZ10（配列番号：3）の配列を提供する。発現カセットは、左側および右側AAV逆方向反復塩基配列（ITR；ヌクレオチド約1～144と4885～5048）、B型肝炎ウイルスEnhIエンハンサー（ヌクレオチド約149～278）、スペーサー配列（ヌクレオチド約279～399）、イヌBドメイン欠失第VIII因子（ヌクレオチド約428～4790）およびTKポリ（A）配列（ヌクレオチド約4804～4884）を含有する。ヌクレオチド428～4790によってコードされるイヌBドメイン欠失第VIII因子もこの図および配列番号：4に示す。

[图1]

FIGURE 1

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
TGGGCACTCC	CTCTCTGGGC	GCTGGCTGGC	TCACTGAGGC	CGGGGGAACA	50
AAGGTGGCCC	GACGCCCCGG	CTTTGCCCCG	GCGGCTCAG	TGAGGAGCG	100
AGGCGGCAGA	GAGGGAGTGG	OCACTOCAT	CACTAGGGGT	TOCTCAGATC	150
TCTTTCTAAG	TAAACAGTAC	ATGAACCTTT	AACCGTTGC	TOGGCAACGG	200
CCTGGTCTGT	GCCAAGTGTT	TGCTGACGCA	AACCCACTG	GCTGGGGCTT	250
GGCCATAGGC	CATCAGGCGA	TGGGATCTC	AGTGTTGGTT	TGCAAGAGGA	300
AGCAAAAAGC	CTCTCCACCC	AGGCTGGAA	TGTTTCACCC	CAATGTGAG	350
CAGTGTGGTT	TTGCAAGAGG	AAGCAAAAAG	CTCTCCACCC	CAGGCTGGA	400
CTGAGAGCT	TGACCACCA	TGCAATAGA	GCTCTCCACC	TGCTTCTTTC	450
	M etGlnIleG1	uLeuSerThr	CysPhePheL		
TGTGCTTTT	GCGATTCTGC	TTTAGTGGCA	CCAGAAGATA	CTAAGTGGGT	500
euCysLeuLe	uArgPheCys	PheSerAlaT	hrArgArgTy	rTyrLeuGly	
GCAGTGGAA	TGTCATGGGA	CTATATGCAA	AGTGATCTCG	GTGAGCTGOC	550
AlaValGluL	euSerTrpAs	pTyrMetGln	SerAspLeuG	lyGluLeuPr	
TGTGGAGCGA	AGATTTCCTC	CTAGAGTGCC	AAAACTTTT	OCATTCAACA	600
oValAspAla	ArgPheProP	roArgValPr	oLysSerPhe	ProPheAsnT	
CTCAGTGGT	GTACAAAAG	ACTCTGTTTG	TAGAATTCAC	GGTTCACCTT	650
hrSerValVa	lTyrLysLys	ThrLeuPheV	alGluPheTh	rValHisLeu	
TTCAACATCG	CTAAGCCAAG	GCCACCTGG	ATGGGCTGCG	TAGGTCTTAC	700
PheAsnIleA	laLysProAr	gProProTrp	MetGlyLeuL	euGlyProTh	
CATOCAGGCT	GAGGTTTATG	ATACAGTGGT	CATTACACTT	AAGACATGG	750
rIleGlnAla	GluValTyrA	spThrValVa	lIleThrLeu	LysAsnMeta	
CTTCCATOC	TGTCAGTCTT	CATGCTGTTG	GTTGATCTTA	CTGGAAAGCT	800
laSerHisPr	oValSerLeu	HisAlaValG	lyValSerTy	rTrpLysAla	
TCCTAGGCGAG	CTGAATATGA	TGATCAGACC	AGTCAAAGGG	AGAAAGAAGA	850
SerGluGlyA	laGluTyrAs	pAspGlnThr	SerGlnArgG	luLysGluAs	
TGATAAAGTC	TTCCTGGTGG	GAAGCCATAC	ATATGCTCTG	CAGGTCTCTGA	900
pAspLysVal	PheProGlyG	lySerHisTh	rTyrValTrp	GlnValLeuL	
AAGAGAATGG	TCCAATGGCC	TCTGACCCAC	TGTGCTTAC	CTACTCATAT	950
ysGluAsnG1	yProMetAla	SerAspProL	euCysLeuTh	rTyrSerTyr	

【図1-1】

FIGURE 1 (cont.)

10	20	30	40	50
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
CTTCTCATG	TGGACCTGGT	AAAAGACTTG	AATTCAGGCC	TCATTGGAGC
LeuSerHisV	alAspLeuVa	lLysAspLeu	AsnSerGlyL	eulleGlyAl
CCCTACTAGTA	TGTACAGAAG	GGAGTCTGGC	CAAGGAAAAG	ACACAGACCT
aLeuLeuVal	CysArgGluG	lySerLeuAl	alysGluLys	ThrGlnThrL
TGCACAAATT	TATACTACTT	TTTGCCTGAT	TTCATGAAGG	GAAAAGTTGG
euHisLysPh	eilleLeuLeu	PheAlaValP	heAspGluGl	ylLysSerTrp
CACTCAGAAA	CAAAGAACTC	CTTGCATCCAG	GATAGGGATG	CTGCATCTGC
HisSerGluT	hrLysAsnSe	rLeuMetGln	AspArgAspA	laAlaSerAl
TOGGGCTGG	CTTAAAATGC	ACACAGTCAA	TGGTTATGTA	AACAGGCTC
aArgAlaTrp	ProLysMeth	isThrValAs	nglyTyrVal	AsnArgSerL
TGCCAGGTCT	GATTGGATGC	CACAGGAAAT	CAGTCTATTG	GCATGIGATT
euProGlyLe	ulleGlyCys	HisArgLysS	erValTyrTr	phisValTle
GGAAATGGCA	CCAETCTGA	AGTGCATCA	ATATTCTCTG	AAGGTCACAC
GlyMetGlyT	hrThrProGl	uValHisSer	tlePheLeuG	luGlyHisTh
ATTTCCTGIG	AGGAACATC	GCCAGGCGTC	CTTGGAAATC	TGGCCAATAA
rPheLeuVal	ArgAsnHisA	rgGlnAlaSe	rLeuGluTle	SerProLleT
CTTTCCTTAC	TGCTCAACA	CTCTTGATGG	AOCCTGGACA	GTTTCTACTG
hrPheLeuTh	rAlaGlnThr	LeuLeuMetA	spLeuGlyGln	nPheLeuLeu
TTTGTGCTATA	TCCTCTTCCA	CCAACATGAT	GCCATGGAAG	CTTATGTCAA
PheCysHisI	leSerSerHi	sGlnHisAsp	GlyMetGluA	latyrValLys
AGTAGACAGC	TGTCCAGAGG	AACCCCAACT	ACGAATGAAA	AATAATGAAG
sValAspSer	CysProGluG	luProGlnLe	uArgMetLys	AsnAsnGluG
AAGCGGACGA	CTATGATGAT	GATCTTACTG	ATTCTGAAAT	GCATGIGGTC
luAlaGluAs	ptyrAspAsp	AspLeuThra	spSerGluMe	tAspValVal
AGGTTCGATG	ATGACAACTC	TOCTTCTTTT	ATCCAAATTC	GCTCAGTTGC
ArgPheAspA	spAspAsnSe	rProSerPhe	lleGlnlleA	rgSerValAl
CAAGAAGCAT	CCTAAAACCT	GGGTACATTA	CATTGCTGCT	GAAGAGGAGG
alLysLysHis	ProLysThrT	rpValHisty	rIleAlaAla	GluGluGluA
ACTGGGACTA	TGCTCCCTTA	GTCCTGGGCC	CCGATGACAG	AAGTTATAAA
spTrpAspTy	rAlaProLeu	ValLeuAlaP	roAspAspAr	gSerTyrLys
AGTCAATATT	TGAACAATGG	CCCTCAGCGG	ATTGGTAGGA	AGTACAAAAA
SerGlnTyrL	euAsnAsnGl	yProGlnArg	lleGlyArgLys	TyrLysLys
AGTCGGATTT	ATGGCATACA	CAGATGAAAC	CTTTAAGACT	GGTGAAGCTA
sValArgPhe	MetAlaTyrT	hrAspGluTh	rPheLysThr	ArgGluAlaI
TTCAGCATGA	ATCAGGAATC	TIGGGACCTT	TACTTTATGG	GCAAGTTGGA
leGlnHisGl	uSerGlylle	LeuGlyProL	euLeuTyrGl	yGluValGly
GACACACTGT	TGATTATATT	TAGAATCAA	GCAAGCAGAC	CATATAACAT
AspThrLeuL	euillellePh	eLysAsnGln	AlaSerArgP	roTyrAsnL

【図1-2】

FIGURE 1 (cont.)

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
CTACCTCAC	GGAATCACTG	ATGTCGGTCC	TTTGTATTCA	AGGAGATTAC	1950
eTyrProHis	GlyIleThrA	spValArgPr	oLeuTyrSer	ArgArgLeuP	
CAAAAGGTGT	AAAACATTTC	AAGGATTTTC	CAATTCTGOC	AGGAGAAATA	2000
roLysGlyVa	lLysHisLeu	LysAspPheP	roLleLeuPr	oGlyGluIle	
TTCAAATATA	AATGGACAGT	GACTGTAGAA	GATGGGOCOA	CTAAATCAGA	2050
PheLysTyrL	ysTrpThrVa	lThrValGlu	AspGlyProT	hrLysSerAs	
TCCTCGGTGC	CTGACCGGCT	ATTACTCTAG	TTTGTGTAAT	ATGGAGAGAG	2100
pProArgCys	LeuThrArgT	yrTyrSerSe	rPheValAsn	MetGluArgA	
ATCTAGCTTC	AGGACTCATT	GGCCCTCTCC	TCATCTGCTA	CAAAGAATCT	2150
spLeuAlaSe	rglyLeuIle	GlyProLeuL	euIleCysTy	rLysGluSer	
GTAGATCAAA	GAGGAAACCA	GATAATGTCA	GACAAGAGGA	ATGTATCTCT	2200
ValAspGlnA	rgGlyAsnGl	nIleMetSer	AspLysArgA	snValIleLe	
GTTTTCTGTA	TTTGATGAGA	ACCGAAGCTG	GTACCTCACA	GAGAATATAC	2250
uPheSerVal	PheAspGluA	snArgSerTr	pTyrLeuThr	GluAsnIleG	
AAOGCTTTCT	OOCCAATOCA	GCTGGAGTGC	AGCTTGAGGA	TOCAGAGTTC	2300
lnArgPheLe	uProAsnPro	AlaGlyValG	lnLeuGluAs	pProGluPhe	
CAAGCTCTCA	ACATCATGCA	CAGCATCAAT	GGCTATGTTT	TTGATAGTTT	2350
GlnAlaSerA	snIleMethi	sSerIleAsn	GlyTyrValP	heAspSerLe	
GCAGTTGTCA	GTTTGTITTC	ATGAGGIGGC	ATACIGGTAC	ATCTTAAGCA	2400
uGlnLeuSer	ValCysLeuH	isGluValAl	aTyrTrpTyr	IleLeuSerI	
TTGGAGCACA	GACTGACTTC	CTTCTGTCT	TCTTCTCTGG	ATATACCTTC	2450
leGlyAlaGl	nThrAspPhe	LeuSerValP	hePheSerGl	yTyrThrPhe	
AAACACAAA	TGGTCTATGA	AGACACACTC	ACCTTATTCC	CATCTCAGG	2500
LysHisLysM	etValTyrGl	uAspThrLeu	ThrLeuPheP	roPheSerGl	
AGAAACTGTC	TTCATGTGGA	TGGAAAACCC	AGGTCTATGG	ATTCTGGGGT	2550
yGluThrVal	PheMetSerM	etGluAsnPr	oGlyLeuTrp	IleLeuGlyC	
GCACAACTC	AGACTTTGGG	AACAGAGGCA	TGACCGCTT	ACTGAAGGIT	2600
ysHisAsnSe	rAspPheArg	AsnArgGlyM	etThrAlaLe	uLeuLysVal	
TCTAGTTGTG	ACAAGAACAC	TGGTGATTAT	TACGAGGACA	GTTATGAAGA	2650
SerSerCysA	spLysAsnTh	rglyAspTyr	TyrGluAspS	erTyrGluAs	
TATTTCAGCA	TACTTGCTGA	GTAAAAACAA	TGOCATTGAA	OCAAGAAGCT	2700
pIleSerAla	TyrLeuLeuS	erLysAsnAs	nAlaIleGlu	ProArgSerP	
TCCTCCAGAA	TTCAGACAC	CTAGCACCTA	GGCAAAGCA	ATTTAATGCC	2750
heSerGlnAs	nSerArgHis	ProSerThrA	rgGlnLysGl	nPheAsnAla	
ACCCACCCAG	TCTTGAAAG	CCATCAACGG	GAAATAACTC	GTACTACTCT	2800
ThrProProV	alLeuLysAr	gHisGlnArg	GluIleThrA	rgThrThrLe	
TCAGTCAGAT	CAAGAGGAAA	TTGACTATGA	TGATACCATA	TCAGTTGAAA	2850
uGlnSerAsp	GlnGluGluI	leAspTyrAs	pAspThrIle	SerValGluM	

【図1-3】

FIGURE 1 (cont.)

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
TGAAGAAGGA	AGATTITIGAC	ATTTATGATG	AGGATGAAAA	TCAGAGCCCC	2900
etLysLysGl	uAspPheAsp	IleTyrAspG	IuAspGluAs	nGlnSerPro	
CGCAGCTTTC	AAAAGAAAAC	ACGACACTAT	TTTATTCCTG	CAGTGGAGAG	2950
ArgSerPheG	InLysLysTh	rArgHisTyr	PheIleAlaa	laValGluAr	
GCTCTGGGAT	TATGGGATGA	GTAGCTCCCC	ACATGTTCTA	AGAAACAGGG	3000
gLeuTrpAsp	TyrGlyMetS	erSerSerPr	ohisValLeu	ArgAsnArga	
CTCAGAGTGG	CAGTGTCCCT	CAGTTCACAA	AAGTGTGTTT	CCAGGAATTT	3050
laGlnSerGl	ySerValPro	GlnPheLysL	ysValValPh	eGlnGluPhe	
ACGTATGGCT	CCCTTACTCA	GOCTTATAC	CGTGGAGAAC	TAAATGAACA	3100
ThrAspGlyS	erPheThrGl	nProLeuTyr	ArgGlyGluL	euAsnGluHi	
TTTGGGACTC	CTGGGGCCAT	ATATAAGAGC	AGAAGTIGAA	GATAATATCA	3150
sLeuGlyLeu	LeuGlyProT	yrIleArgAl	agluValGlu	AspAsnIleM	
TGGTAACTTT	CAGAAATCAG	GOCTCTGGTC	CCATATCCCT	CTATTCTAGC	3200
etValThrPh	eArgAsnGln	AlaSerArgP	roTyrSerPh	eTyrSerSer	
CTTATTTCCT	ATGAGGAAGA	TCAGAGGCAA	GGAGCAGAAC	CTAGAAAAAA	3250
LeuIleSerT	yrGluGluAs	pGlnArgGln	GlyAlaGluP	roArgLysAs	
CTTTGICAAAG	CCTAATGAAA	CCAAAACCTA	CITTTTGAAA	GIGCAACATC	3300
nPheValLys	ProAsnGluT	hrLysIhrTy	rPheTrpLys	ValGlnHish	
ATATGGCACC	CACATAAGAT	GAGTTTGACT	GCAAAGCCCTG	GGCTTATTTC	3350
isMetAlaPr	oThrLysAsp	GluPheAspC	ysLysAlaTr	pAlaTyrPhe	
TCGTATGTIG	ACCTGGAAAA	AGATGTGCAC	TCAGGCTGTA	TTGGACCCCT	3400
SerAspValA	spLeuGluLy	sAspValHis	SerGlyLeuT	leGlyProLe	
TCGTGCTGTC	CACACTAACA	CACGAAACC	TGCTCATGGG	AGACAAGTGA	3450
uLeuValCys	HisThrAsnT	hrLeuAsnPr	oAlaHisGly	ArgGlnValT	
CAGTACAGGA	ATTTCCTCTG	TTTTTCACCA	TCTTTGATGA	GACCAAAAGC	3500
hrValGlnGl	uPheAlaLeu	PhePheThrT	lePheAspGl	uThrLysSer	
TGGTACTTCA	CTGAAAATAT	GGAAAGAAAC	TGCAGGGCTC	CTGCAATAT	3550
TrpTyrPheT	hrGluAsnMe	tGluArgAsn	CysArgAlaP	roCysAsnIl	
CCAGATGGAA	GATCCACTTT	TTAAAGAGAA	TTATGGCTTC	CATGCCAATCA	3600
eGlnMetGlu	AspProIhrP	heLysGluAs	nTyrArgPhe	HisAlaIleA	
ATGGCTACAT	AATGGATACA	CTACCTGGCT	TAGTAATGGC	TCAGGATCAA	3650
snGlyTyrIl	eMetAspThr	LeuProGlyL	euValMetAl	agInAspGln	
AGGATTGCGT	GGTATCTGCT	CAGCATGGGC	AGCAATGAAA	ACATCCATTC	3700
ArgIleArgT	rpLyrLeuLe	uSerMetGly	SerAsnGluA	snIleHisSe	
TATTCATTTT	AGTGGACATG	TGTTCACTGT	ACGAAAAAAA	GAGGAGTATA	3750
rIleHisPhe	SerGlyHisV	alPheThrVa	lArgLysLys	GluGluTyrL	
AAATGGCACT	GTACAATCTC	TATCCAGTIG	TTTTTGAGAC	AGTGGAAATG	3800
ysMetAlaLe	uTyrAsnLeu	TyrProGlyV	alPheGluTh	rValGluMet	

【图1-4】

FIGURE 1 (cont.)

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
TTAOCATCCA	AAGCTGGAAT	TIGGCGGGTG	GAATGOCCTA	TIGGCGAGCA	3850
LeuProSerL	ysAlaGlyIL	eTrpArgVal	GluCysLeuI	leGlyGluHi	
TCTACATGCT	GGGATGAGCA	CACTTTTCT	GGTGACAGC	AATAAGIGTC	3900
sLeuHisAla	GlyMetSerT	hrLeuPheLe	uValTyrSer	AsnLysCysG	
AGACTCCCT	GGGAATGGCT	TCTGGACACA	TTAGAGATT	TCAGATTACA	3950
lnThrProLe	uGlyMetAla	SerGlyHisI	leArgAspPh	eGlnIleThr	
GCTTCAGGAC	AATATGGACA	GTGGGCCCCA	AAGCTGGCCA	GACTTCATTA	4000
AlaSerGlyG	lnTyrGlyGI	nTrpAlaPro	LysLeuAlaA	rgLeuHisty	
TTCCGGATCA	ATCAATGCT	GGAGCAOCAA	GGAGCCCTTT	TCTTGGATCA	4050
rSerGlySer	IleAsnAlaT	rpSerThrIy	sGluProPhe	SerTrpIleL	
AGGIGGATCT	GTGGCACCA	ATGATTATTC	ACGGCATCAA	GAOCCAGGCT	4100
ysValAspLe	uLeuAlaPro	MetIleIleH	isGlyIleLy	sThrGlnGly	
GCCCGTCAGA	AGTCTCCAG	CCCTACATC	TCTCAGTTTA	TCATCATGTA	4150
AlaArgGlnL	ysPheSerSe	rLeuTyrIle	SerGlnPheI	leIleMetTy	
TAGTCTTGAT	GGGAAGAAGT	GGCAGACTTA	TCGAGGAAAT	TCCACTGGAA	4200
rSerLeuAsp	GlyLysLysT	rpGlnThrTy	rArgGlyAsn	SerThrGlyT	
OCTTAATGGT	CTTCTTTGGC	AATGTGGATT	CATCTGGGAT	AAAACACAAT	4250
hrLeuMetVa	lPhePheGly	AsnValAspS	erSerGlyIL	eLysHisAsn	
ATTTTAAACC	CIOCAATTAT	TGCTOGATAC	ATCGTTTTC	AOCCAACTCA	4300
IlePheAsnP	roProIleIL	eAlaArgTyr	IleArgLeuH	isProThrHi	
TTATAGCATT	CCAGCACATC	TTGGCATGGA	GTGATGGGC	TGTGATTTAA	4350
sTyrSerIle	ArgSerThrL	euArgMetGL	uLeuMetGly	CysAspLeuA	
ATAGTTGCAG	CATGCCATTG	GGATGGAGA	GTAAGCAAT	ATCAGATGCA	4400
snSerCysSe	rMetProLeu	GlyMetGluS	erLysAlaIL	eSerAspAla	
CAGATTACTG	CTTCATCTTA	CTTTACCAAT	ATGTTTGGCA	CCIGGCTCTC	4450
GlnIleThrA	laSerSerTy	rPheThrAsn	MetPheAlaT	hrTrpSerPr	
TTCAAAGCT	CGACTTCACC	TOCAAGGGAG	GAGTAATGOC	TGGAGACCTC	4500
oSerLysAla	ArgLeuHisL	euGlnGlyAr	gSerAsnAla	TrpArgProG	
AGGTCATATA	TOCAAAGAG	TGGCTGCAAG	TGGACTTCCA	GAAGACAATG	4550
lnValAsnAs	nProLysGlu	TrpLeuGlnV	alAspPheGl	nLysThrMet	
AAAGTCACAG	GAGTAACTAC	TCAGGGAGTA	AAATCTCTGC	TTACCAGCAT	4600
LysValThrG	lyValThrTh	rGlnGlyVal	LysSerLeuL	eThrSerMe	
GTATGIGAAG	GAGTTCCTCA	TCTCCAGCAG	TCAAGATGGC	CATCAGTGGC	4650
tTyrValLys	GluPheLeuI	leSerSerSe	rGlnAspGly	HisGlnTrpT	
CTCTCTTTTT	TCAGAAATGC	AAAGTAAAGG	TTTTTCAGGG	AAATCAAGAC	4700
hrLeuPhePh	eGlnAsnGly	LysValLysV	alPheGlnGl	yAsnGlnAsp	
TOCTTCACAC	CTGTGGTGAA	CTCTCTAGAC	CCACCGTTAC	TGACTCGCTA	4750
SerPheThrP	roValValAs	nSerLeuAsp	ProProLeuL	eThrArgTy	

【図1-5】

FIGURE 1 (cont.)

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
OCTTGGATT	CAGCCOCAGA	GTGGGGTGCA	CCAGATTGCC	CTGAGGATGC	4800
rLeuArgIle	HisProGlnS	erTrpValHi	sgInIleAla	LeuArgMetG	
AGGTTCTGGG	CTGCGAGGCA	CAGGACCTCT	ACTGACTCGA	GCGAGTCTTT	4850
luValLeuGl	yCysGluAla	GlnAspLeuT	yr...		
CTGAGGGGAT	GGGCAATAAA	AAGACAGAAT	AAAACGCACG	GGTGTGGGGT	4900
CGTTTGTTGG	GATCCAGATC	TAGGAACCCC	TAGTGATGCA	GTGGGCACT	4950
CCCTCTCTGC	GGGCTGGCTC	GCTCAGTGAG	GGCGCCCGGG	CAAAGCCCGG	5000
GCGTGGGGCG	ACCCTTGGTC	GGCGGGGCTC	AGTGAGGGAG	CGAGGGGGCA	5050
GACAGGGAGT	GGCAACCCCC	CGGGGGGGGC	CCCTTCGAGC	CCAGCTGCAT	5100
TAATCAATCG	GCCAAGGGCC	GGGGAGAGGC	GGTTTGGGTA	TTCGGGGCTC	5150
TTCGGCTTCC	TGGGTCACTC	ACTGGCTGGG	CTCGGTGGTT	CGGCTGGGGC	5200
GAGGGGTATC	AGCTCACTCA	AAGGGGGTAA	TACGGTTATC	CACAGAATCA	5250
GGGGATAACG	CAGGAAGAA	CATGTGAGCA	AAAGGGCCAGC	AAAAGGGCCAG	5300
GAAGGGTAAA	AAGGGGGCGT	TGGTGGGGTT	TTTCCATAGG	CTCGGGGGCC	5350
CTGACGAGCA	TCACAAAAT	CGAGGCTCAA	GTCAGAGGTG	GCGAAAACCG	5400
ACAGGACTAT	AAAGATAACA	GGGGTTTCCC	CCCTGGAAGCT	CCCTGGTGGG	5450
CTCTGGTGT	CGGACCTGCG	GGCTTACCGG	ATACTGTGCC	GCCCTTCTCC	5500
CTTGGGGAAG	CGTGGGGGTT	TCTCAATGCT	CAAGCTGTAG	GTATCTGAGT	5550
TOGGTGTAGG	TGGTGGCTC	CAAGCTGGGC	TGTGTGCACG	AAAGGGGGGT	5600
TCAGGGGAC	CGCTGGGGCT	TATCGGGTAA	CTATGGTCTT	GAGTGGAAAC	5650
GGTAAAGACA	CGACTTATCG	CCACTGGCAG	CAGCCACTGG	TAACAGGATT	5700

【図1-6】

FIGURE 1 (cont.)

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
<u>AGCAGAGCGA</u>	<u>GGTATGTAGG</u>	<u>CGGTGCTACA</u>	<u>GAGTTCCTGA</u>	<u>AGTGGTGGCC</u>	5750
<u>TAACTACGGC</u>	<u>TACACTAGAA</u>	<u>GGACAGTATT</u>	<u>TGGTATCTGC</u>	<u>GCTCTGCTGA</u>	5800
<u>AGOCAGTTAC</u>	<u>CTTCGGAAAA</u>	<u>AGAGTGGTGA</u>	<u>GCTCTTGATC</u>	<u>CGGCAAACAA</u>	5850
<u>ACCACCGCTG</u>	<u>GTAGGGGTGG</u>	<u>TTTTTTTGTT</u>	<u>TGCAAGCAGC</u>	<u>AGATTACGGG</u>	5900
<u>CAGAAAAAAA</u>	<u>GGATCTCAAG</u>	<u>AAGATCCCTT</u>	<u>GATCTTTTCT</u>	<u>ACGGGGTCTG</u>	5950
<u>AOGCTCAGTG</u>	<u>GAAOGAAAAC</u>	<u>TCAOGTTAAG</u>	<u>GGATTTTGGT</u>	<u>CATGAGATTG</u>	6000
<u>TCAAAAAGGA</u>	<u>TCTTCAOCTA</u>	<u>GATCCTTTTA</u>	<u>AATTAAAAAT</u>	<u>GAAGTTTAA</u>	6050
<u>ATCAATCTAA</u>	<u>AGTATATATG</u>	<u>AGTAACTTIG</u>	<u>GTCTGACAGT</u>	<u>TACCAATGCT</u>	6100
				ylGelIres	
<u>TAATCAGTGA</u>	<u>GGCAOCTATC</u>	<u>TCAGOGATCT</u>	<u>GTCTATTTTG</u>	<u>TTCATOCATA</u>	6150
ueL...siHo	rPlav...gr	AueLreSgrA	psAelIulGn	sateMprTue	
<u>GTIGOCIGAC</u>	<u>TCCCCGTGGT</u>	<u>GTAGATAACT</u>	<u>ACGATAOCCG</u>	<u>AGGGCTTACC</u>	6200
InlGgrAlav	ylGgrAgrAr	htreSueL..	.reSlavorP	orPreSlavt	
<u>ATCTGGCCCC</u>	<u>AGTGTGCAA</u>	<u>TGATACGGG</u>	<u>AGACCCAGC</u>	<u>TCACCGGCTC</u>	6250
eMnlGylGpr	TsiHnlGueL	reSlavAlau	eLylGlaVre	SlavorPulG	
<u>CAGATTATATC</u>	<u>AGCAATAAAC</u>	<u>CAGOCAGCCG</u>	<u>GAAGGGCCGA</u>	<u>GCGCAGAAGT</u>	6300
ueLnsAelIu	eLueLueLyl	GalAueLgrA	ehPorPgrAa	lasyOehPsi	
<u>GGTCTGCAA</u>	<u>CTTTATCCGC</u>	<u>CTCCATCCAG</u>	<u>TCTATTAAAT</u>	<u>GTIGCCGGGA</u>	6350
HpsAnlGueL	syLeLlgrAg	rAprTylGrh	T.....nsA	nsAylGorPu	
<u>AGCTAGAGTA</u>	<u>AGTAGTTCCG</u>	<u>CAGTTAATAG</u>	<u>TTTGGCCAAC</u>	<u>GTGTGTGCA</u>	6400
eL...ueLue	LryTnsAala	ueL...ryTh	sAalAsyOgr	AnlGnlGprT	
<u>TTGCTACAGG</u>	<u>CATGTGGTGG</u>	<u>TCAOGCTGGT</u>	<u>CGTTTGGTAT</u>	<u>GGCTTCATTC</u>	6450
nlG...ueLs	yOgrAorPrh	TlaVreShtT	rhThlGryTo	rPsyLtem..	
<u>AGCTCCGGTT</u>	<u>CCCAACGATC</u>	<u>AAGGOGAGTT</u>	<u>ACATGATCC</u>	<u>CCATGTGTGG</u>	6500
.reSgrAnsa	ylGlaVelIu	eLalaueL..	.teMelIylG	prThhThhTs	
<u>CAAAAAGCG</u>	<u>GTTAGCTCCT</u>	<u>TGGTCCCTCC</u>	<u>GATCGTTGTC</u>	<u>AGAAGTAAAGT</u>	6550
yOehPueLor	P...reSgrA	grApsAulGr	eSgrAnlG..	.ehPryThhT	
<u>TGGCCGCGAT</u>	<u>GTTATCACTC</u>	<u>ATGGTATATG</u>	<u>CAGCACTGCA</u>	<u>TAATTCCTCT</u>	6600
orPgrAueLr	htelllav..	.orP...orP	ueLlaValAr	yTnsAulG..	
<u>ACTGTATATG</u>	<u>CATCGTAAAG</u>	<u>ATGCTTTTCT</u>	<u>GTGACTGGTG</u>	<u>AGTACTCAAC</u>	6650
.nlG...ala	temgrAueLe	lIreSsyInl	GreSnlGsiH	rhTreSueIp	



【図1-7】

FIGURE 1 (cont.)

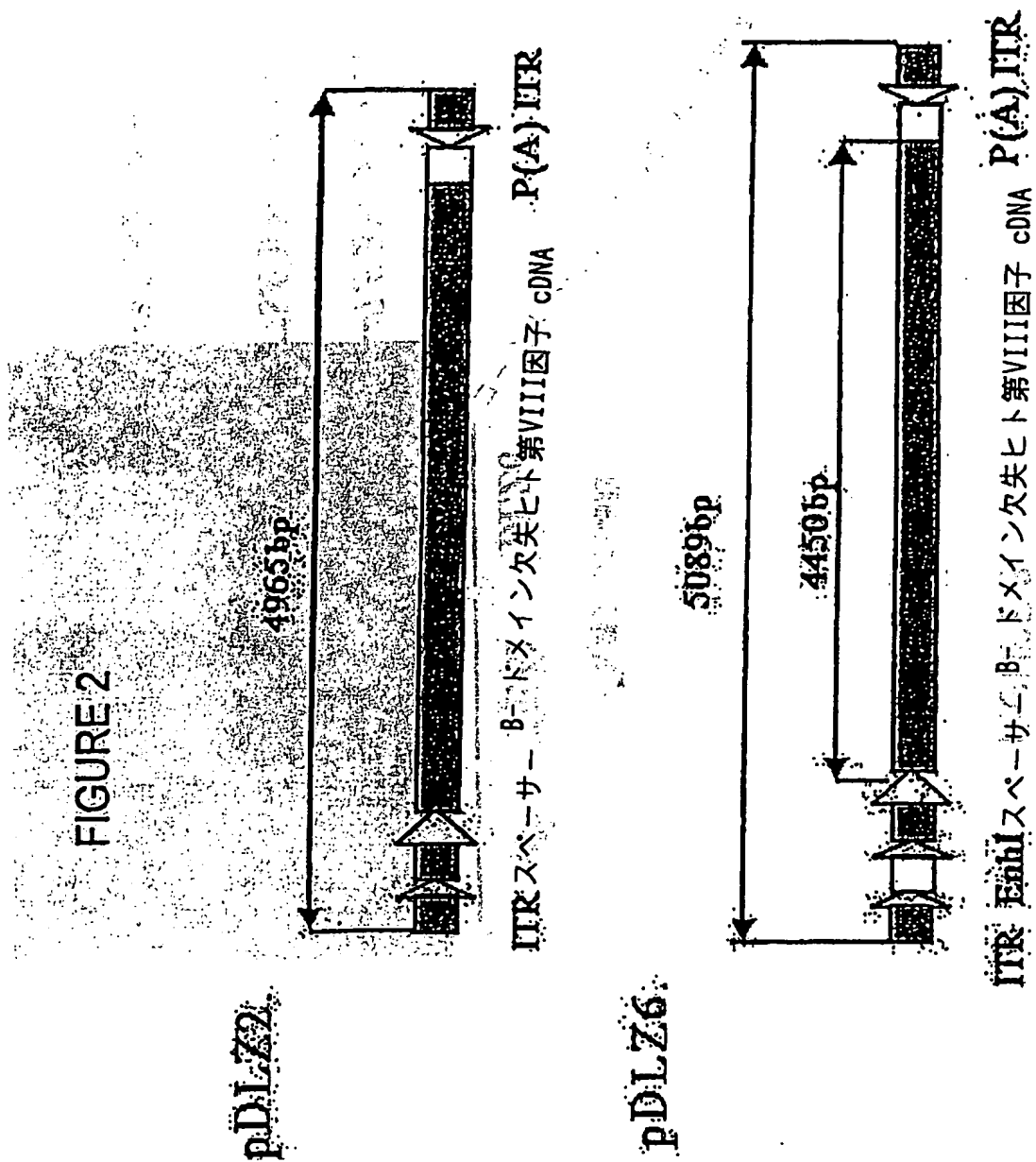
10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
CAAGTCATTC	TGAGAATAGT	GIATGCGGCG	AGGGAGTTC	TCCTGCGCGG	6700
rThtTtemGr	AueLellht	ryTalaalAl	avresnsare	SsylylGorP	
CGTCAATAAG	GGATAATAAC	GGGCCACATA	GCAGAACTTT	AAAAGTGCTC	6750
rhTuelLaVo	rPrylrylgr	AalAlavryT	syCehPsyLu	eLueLala..	
ATCATITGGA	AAOGTTCITC	GGGGCGAAAA	CTCTCAAGGA	TCCTAACGCT	6800
....nlGehP	lavnsAsyLo	rPalAehPla	VgrAueLres	grAlaValAr	
GTTCAGATCC	AGTTCGATGT	AAOCCACTCG	TGCACCCAAC	TCATCTTCAG	6850
hTreSelIpr	TnsAreSht	lavprTulGs	iHlavprTre	SelIsyLueL	
CATCTTTTAC	TTTCAACCAGC	GTTCCTGGGT	GAGCAAAAAC	AGGAAGGCCAA	6900
temSyL...s	YL...prlgr	AsylnlGht	ueLueLehPu	eLehPalAeh	
AATGCGGCAA	AAAAGGGAAT	AAGGGGAGCA	CGGAAATGTT	GAATACTCAT	6950
PsiHgrAueL	ehPorPehPu	eLorPresla	VreSelInsA	ehPlav...l	
ACTCTTCCTT	TTTCAATATT	ATTCAGGCAT	TTATCAGGGT	TATTCGTCTCA	7000
TGAGCGGATA	CATATTIGAA	TGTATTTAGA	AAAATAAACA	AATAGGGGTT	7050
CGGCGCACAT	TTCCCCGAAA	AGTCCCACT	GACGTCTAAG	AAACCATTAT	7100
TATCATGACA	TTAAOCTATA	AAAATAGGCG	TATCAGGAGG	COCTTTGCTC	7150
TOGOGGTTT	CGGTGATGAC	GGTGAAAACC	TCTGACACAT	GCAGCTCCCG	7200
GAGAOGSTCA	CAGCTTGCTCT	GTAAGGGGAT	GCCGGGAGCA	GACAAGGCGG	7250
TCAGGGGCGG	TCAGGGGGTG	TTCGGGGGTG	TGGGGGCTGG	CTTAACATAG	7300
CGGCATCAGA	GCAGATTGTA	CTGAGAGTGC	ACCATATGCG	GTGTGAAATA	7350
CGGCACAGAT	GCGTAAGGAG	AAAATACGCG	ATCAGGAAAT	TGTAAACGTT	7400
<u>AATATTTTGT</u>	<u>TAAATTTGCG</u>	<u>GTTAAATTTT</u>	<u>TGTTAAATCA</u>	<u>GCTCATTTTT</u>	7450
<u>TAAOAAATAG</u>	<u>GCGGAAATCG</u>	<u>GCAAAATCCC</u>	<u>TTATAAATCA</u>	<u>AAAGAATAGA</u>	7500
<u>CCGAGATAGG</u>	<u>GTTCAGTGTG</u>	<u>GTTCAGTTTT</u>	<u>GGAACAAGAG</u>	<u>TCCACTATTA</u>	7550
<u>AAGAAGGTGG</u>	<u>ACTCCAAOGT</u>	<u>CAAAGGGGGA</u>	<u>AAAACCGTCT</u>	<u>ATCAGGGGGA</u>	7600

【図1-8】

FIGURE 1 (cont.)

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
<u>TGGOOOACTA</u>	<u>CGTGAACCAT</u>	<u>CACCCTAATC</u>	<u>AAGTTTTTTT</u>	<u>GGGTGAGGT</u>	7650
<u>GOOGTAAAGC</u>	<u>ACTAAATCGG</u>	<u>AACCCCTAAG</u>	<u>GGAGCCCCCG</u>	<u>ATTITAGAGCT</u>	7700
<u>TGAOOGGGAA</u>	<u>AGOOOGGAA</u>	<u>CGTGGOGAGA</u>	<u>AAGGAAGGGA</u>	<u>AGAAAGOGAA</u>	7750
<u>AGGAGOGGGC</u>	<u>GCTAGGGGCG</u>	<u>TGCCAAGTGT</u>	<u>AGOGGTCAOG</u>	<u>CTGOGOGTAA</u>	7800
<u>CCAOCACAOC</u>	<u>CGOOGOGCTT</u>	<u>AATGCGOOGC</u>	<u>TACAGGGGCG</u>	<u>GTOGOGOCAT</u>	7850
<u>TOGOCATICA</u>	<u>GGCTAAGCAA</u>	<u>CTGTTGGGAA</u>	<u>GGGOGATOGG</u>	<u>TGOGGGGACTC</u>	7900
<u>TTGGCTATTA</u>	<u>CGOCAGCTGG</u>	<u>CTGCAGGGGG</u>	<u>GGGGGGGGGG</u>	<u>GGGT</u>	7944

【図2】



【図 3】

# FIGURE 3

## 形質導入した細胞

照抄

**DLZ2**

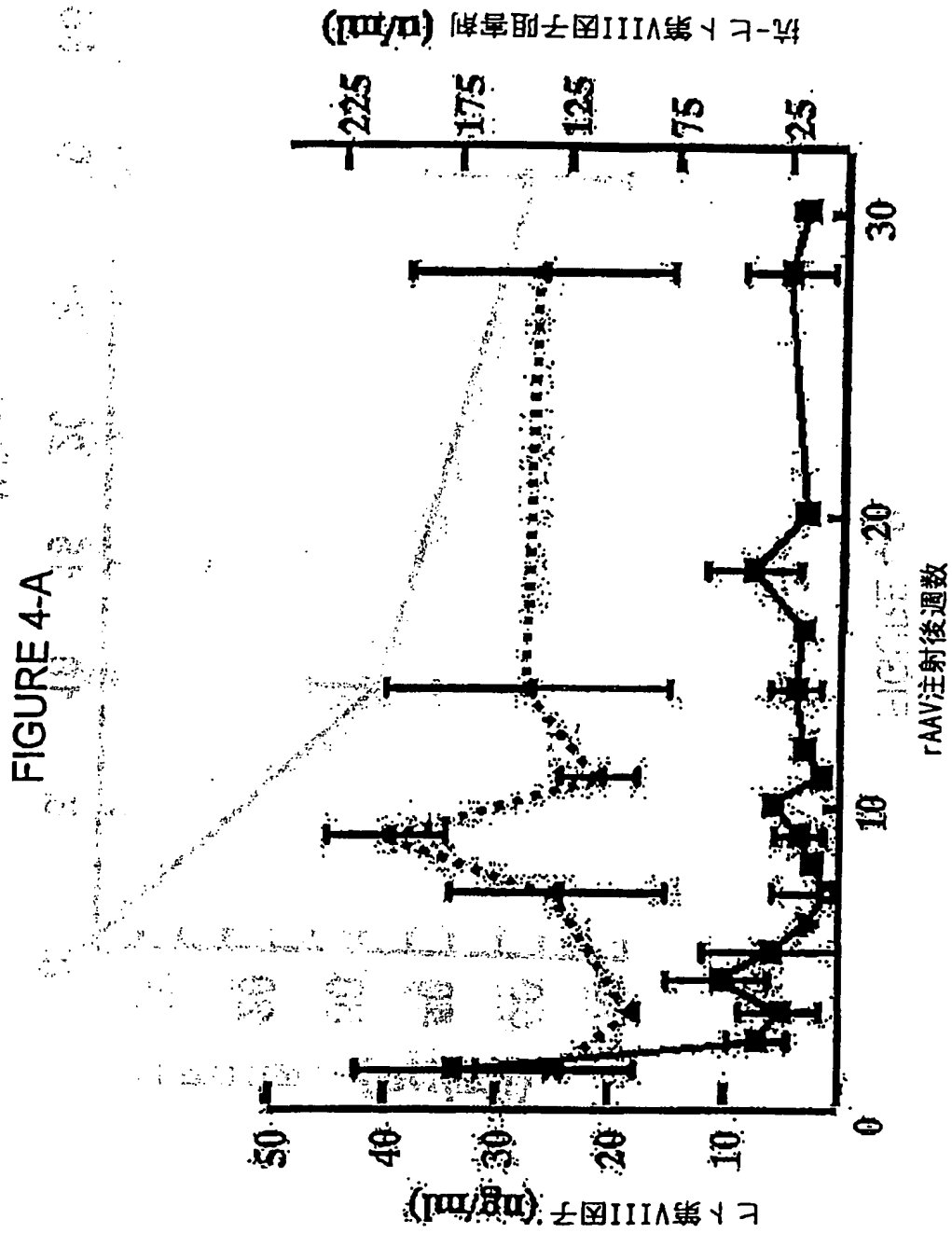
# Index

7.5Kh(ダイヤー)

5.0 Kb (E/V-)

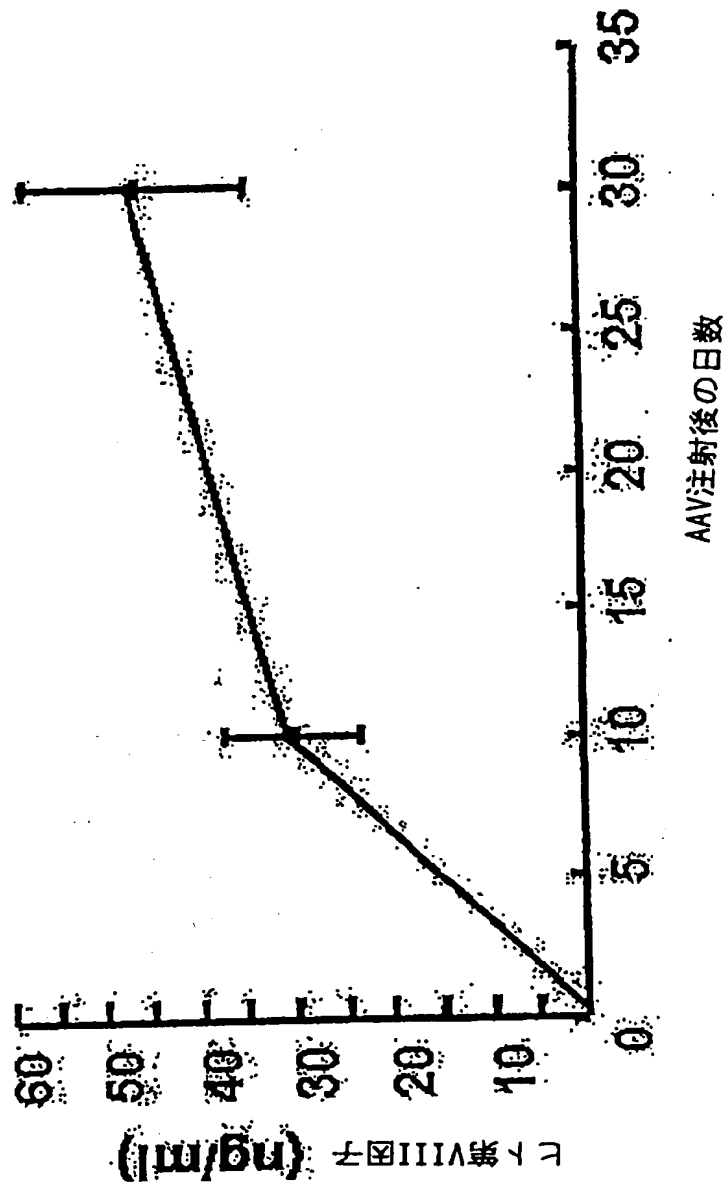
3.0 Kb (1本鎖)

【図4A】

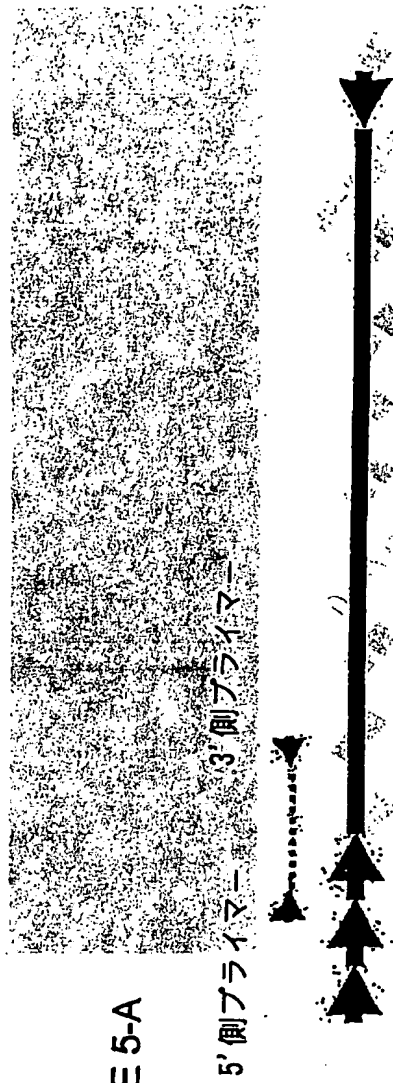


【図4B】

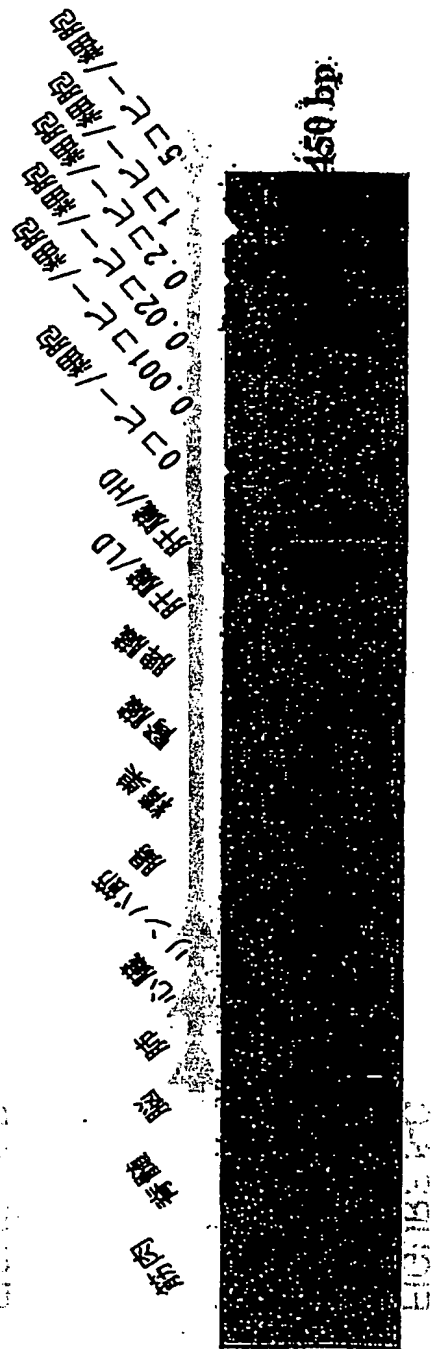
FIGURE 4-B



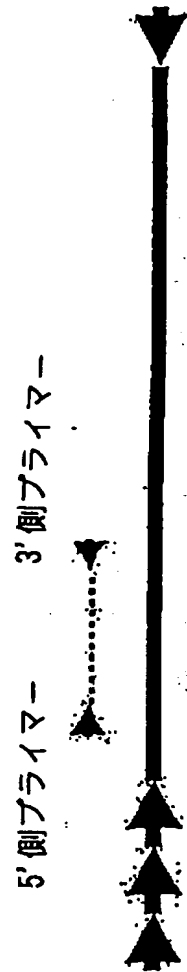
**FIGURE 5-A**



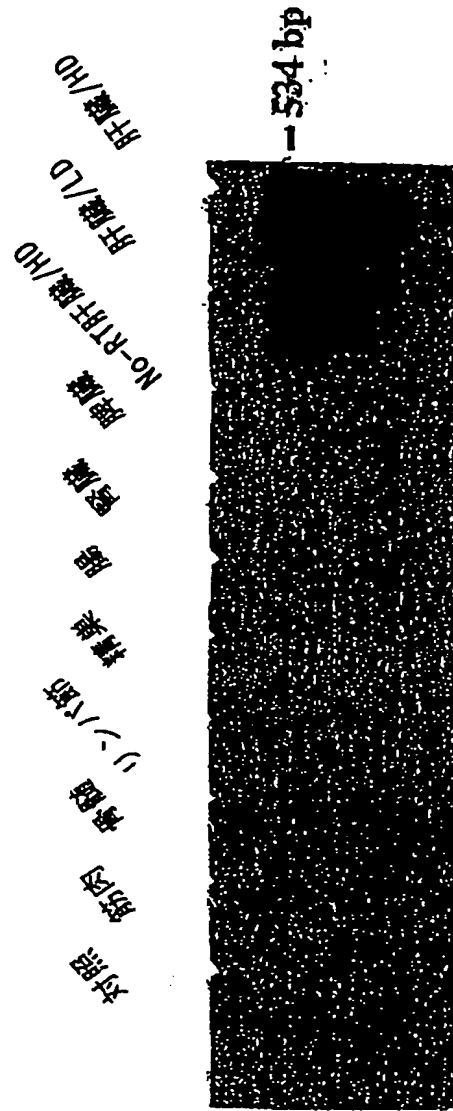
**FIGURE 5-B**



**FIGURE 5-C**

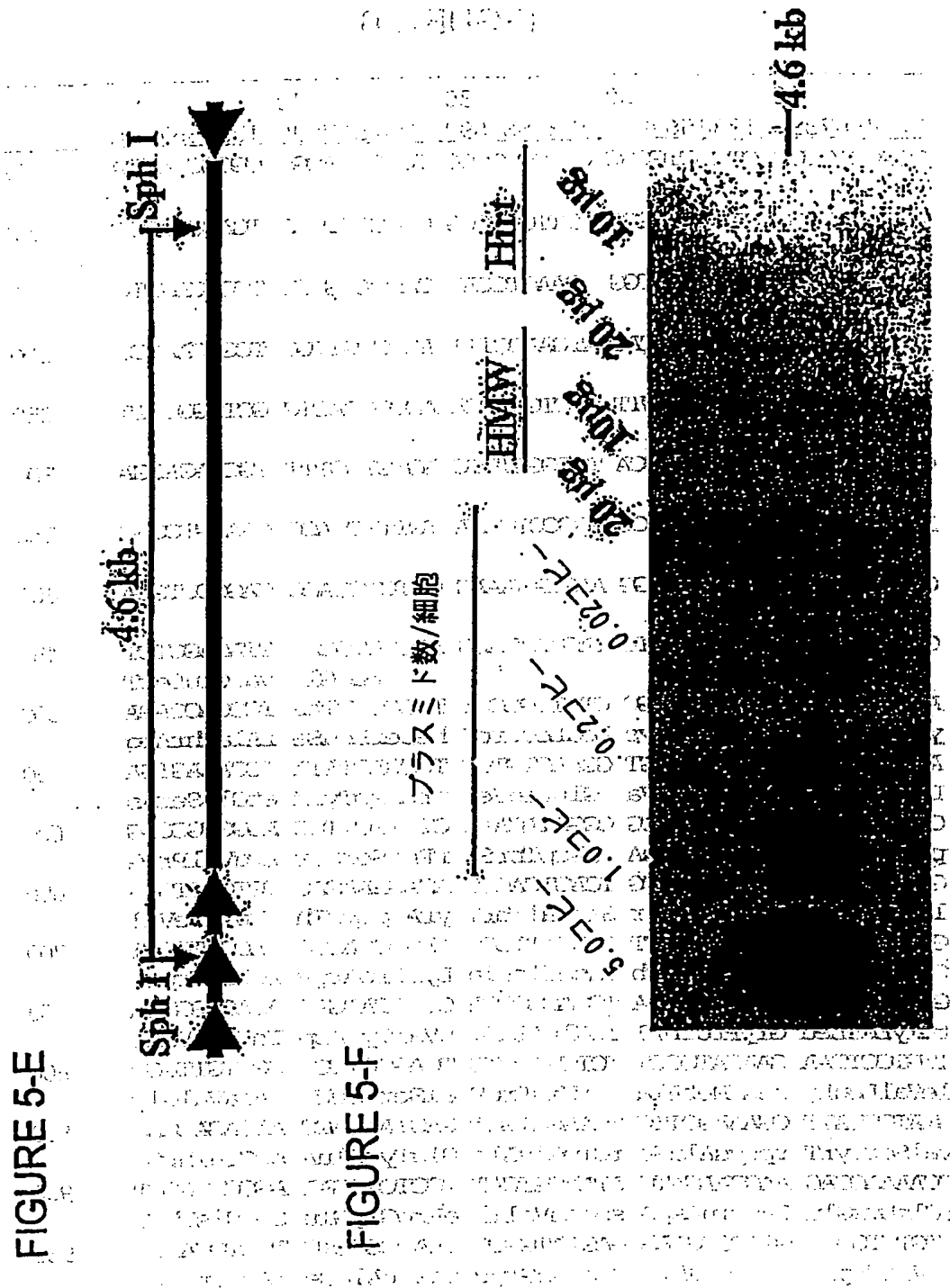


**FIGURE 5-D**





6. Allen



【図6】

FIGURE 6

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
TGGGCACTOC	CTCTCTGGGC	GCTGGCTGGC	TCACGTAGGC	CGGGCGACCA	50
AAGGTGGGCC	GACGGGCGGG	CTTTGGGCGG	GCGGCTCAG	TGAGCGAGCG	100
AGGCGGCAGA	GAGGGAGTGG	CCAACTCCAT	CACTAGGGGT	TOCTCAGATC	150
TCTTTCTAAG	TAAACAGTAC	ATGAACCTTT	ACCCCGTTTC	TGGGCAAGCG	200
CCTGGTCTGT	GCCAAGTGT	TGCTGAGGCA	ACCCCGACTG	GCTGGGGCTT	250
GGGCATAGGC	CATCAGGCGA	TGGGATCTC	AGTGTGGTTT	TGCAAGAGGA	300
AGCAAAAAGC	CTCTCCACCC	AGGCTGGGAA	TGTTTCACCC	CAATGTGGAG	350
CAGTGIGGTT	TTGCAAGAGG	AAGCAAAAAG	CCTCTCCACC	CAGGCTGGGA	400
CTGGACCTGG	AGAGTACTTC	TAGAAATAAG	AGCCATGCAA	GTAGAGCTCT	450
ACAACCTGCTG	CTTTCTGTGC	CTTTTGCCCT	TCAGGCTTAG	TGCCAOCAGA	500
yrThrCysCy	sPheLeuCys	LeuLeuProp	heSerLeuSe	rAlaThrArg	
AAATACTACC	TOGGTGCAGT	GGAACGTGTC	TGGGACIATA	TGCAAAGTGA	550
LysTyrTyrL	eGlyAlaVa	lGluLeuSer	TrpAspTyrM	etGlnSerAs	
OCTGCTCAGT	GCGCTGCACG	CGGATACAAG	CTTTTCTTTC	AGGGTGGCAG	600
pLeuLeuSer	AlaLeuHisA	laAspThrSe	rPheSerSer	ArgValProG	
GATCTTTGCC	ACTCAACCAG	TCAGTCAAGT	ACAGAAAGAC	TGTGTTTGTA	650
lySerLeuPr	oLeuThrThr	SerValThrT	yrArgLysTh	rValPheVal	
GAGTTTACAG	ATGAOCTTTT	CAACATTGCC	AAGGCCAGGC	CAOOGTGGAT	700
GluPheThrA	spAspLeuPh	eAsnIleAla	LysProArgP	roProTrpMe	
GGGCTGCTG	GGTCTACCA	TCCAGGCTGA	GGTTTATGAC	ACAGTGGTCA	750
tGlyLeuLeu	GlyProThrI	leGlnAlaGl	uValTyrAsp	ThrValValI	
TGTGCTTAA	GAACATGGCT	TCTCATCTG	TCAGGCTTCA	CGCTGTGGGT	800
leValLeuLy	sAsnMetAla	SerHisProV	alSerLeuHi	sAlaValGly	
GTATCTATT	GAAAGCTTC	TGAAGGTGCT	GAGTATGAGG	ATCAGACCAG	850
ValSerTyrT	rpLysAlaSe	rGluGlyAla	GluTyrGluA	spGlnThrSe	
CCAAAAGGAG	AAGGAAGATG	ATAATGTICAT	TOCTGGTGAA	AGGCATAOCT	900
rGlnLysGlu	LysGluAspA	spAsnValI	eProGlyGlu	SerHisThrT	
ATGCTGGCA	GGTCTGAAA	GAGAATGGCC	CAATGGGCTC	TGATCCACCA	950
yrValTrpGl	nValLeuLys	GluAsnGlyP	roMetAlaSe	rAspProPro	

【図6-1】

FIGURE 6(cont.)

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
TGTCACCT	ACTCATATTT	TTCACAAGG	GACCTGGTCA	AAGACCTGAA	1000
CysLeuThr	yrSerTyrPh	eSerHisVal	AspLeuValL	ysAspLeuAs	
TTCAGGCTC	ATTGGAGGC	TGCTGGTTTG	CAAAGAAGGG	AGTCIGGCCA	1050
nSerGlyLeu	IleGlyAlaL	eLeuValCy	sLysGluGly	SerLeuAlaL	
AAGAAAGGAC	ACAGACTTG	CAGGAATTG	TGCTACTTTT	TGCTGTATTT	1100
ysGluArgTh	rGlnThrLeu	GlnGluPheV	alleuLeuPh	eAlaValPhe	
GATGAAGCA	AAAGTGGCA	CTCAGAAACA	AATGGTCTT	TGACACAGGC	1150
AspGluGlyL	ysSerTrpHi	sSerGluThr	AsnAlaSerL	eThrGlnAl	
TGAGGCGCAG	CATGAGCTG	ACAGCATCAA	TGGCTATGTA	AACAGGCTCT	1200
agluAlaGln	HisGluLeuH	isThrIleAs	nglyTyrVal	AsnArgSerL	
TGCCAGGCT	TACIGIGGT	CACAAGAGAT	CAGTCTATTG	GCATGIGATT	1250
euProGlyLe	uThrValCys	HisLysArgS	erValTyrTr	pHisValIle	
GGAATGGGCA	CGACCGCGA	AGTGCCTCA	ATTTTCTCTG	AAGGTGACAC	1300
GlyMetGlyT	hrThrProGl	uValHisSer	IlePheLeuG	luGlyHisTh	
ATTCTCTGTG	AGCAACCAAC	GCCAGGCTC	CTTGGAGATC	TCACCAATTA	1350
rPheLeuVal	ArgAsnHisA	rgGlnAlaSe	rLeuGluIle	SerProIleT	
CTTCTCTTAC	TGCTCAGACA	TTCCTGATGG	ACCTTGGCCA	GTTTCTACTG	1400
hrPheLeuTh	rAlaGlnThr	PheLeuMeta	sLeuGlyGl	nPheLeuLeu	
TTTGTGCATA	TGCTTGGCA	TCAAGATGAT	CGTATGGAAG	CTTATGTCAA	1450
PheCysHisI	leProSerHi	sGlnHisAsp	GlyMetGluA	laTyrVally	
AGTAGATAGC	TGCGCAGAGG	AACCGCAGCT	GCGCATGAAA	AATAATGAAG	1500
sValAspSer	CysProGluG	luProGlnLe	uArgMetLys	AsnAsnGluA	
ATAAAGATTA	TGATGATGGT	CTTATGATG	CIGACATGGA	CGTAGTTAGC	1550
spLysAspTy	rAspAspGly	LeuTyrAspS	erAspMetAs	pValValSer	
TTTGATGACG	ACAGCTCTTC	TGCTTTATAT	CAAATCGGCT	CAGTTGCCAA	1600
PheAspAspA	spSerSerSe	rProPheIle	GlnIleArgS	erValAlaLy	
GAAGCATCCT	AAACCTTGGG	TGCCTATAT	TGCCTGCTGAG	GAGGAGGACT	1650
sLysHisPro	LysThrTrpV	alHisTyrIl	eAlaAlaGlu	GluGluAspT	
GGGACTATGC	TGCTCAGGC	CCACCGCCA	ATGATAGAAG	TCATAAAAAT	1700
rpAspTyrAl	aProSerGly	ProThrProA	snAspArgSe	rHisLysAsn	
CTGTATTGTA	ACAATGGTCC	TCAGCGGATT	GGTACGAAGT	ACAAAAAAGT	1750
LeuTyrLeuA	snAsnGlyPr	oGlnArgIle	GlyLysLysT	yrLysLysVa	
CCGATTGIGT	GCATACACAG	ATGAGACATT	TAAGACTGGT	GAAGCTATTG	1800
lArgPheVal	AlaTyrThrA	spGluThrPh	eLysThrArg	GluAlaTleG	
AGTATGAATC	AGGAATGCTG	CGACCTTAC	TATATGGAGA	AGTGGGACAC	1850
lnTyrGluSe	rGlyIleLeu	GlyProLeuL	eTyrGlyGl	uValGlyAsp	
ACACTGCTGA	TTATATTAA	GAATCAAGCC	AGCGGCGCAT	ATAACATCTA	1900
ThrLeuLeuI	leIlePheLy	sAsnGlnAla	SerArgProT	yrAsnIleTy	

【图6-2】

FIGURE 6 (cont.)

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
CCCTCATGGG	ATCAATTATG	TCACCTCTCT	GCACACAGGG	AGATTGOCAA	1950
rProHisGly	IleAsnTyrV	alThrProLe	uHisThrGly	ArgLeuProL	
AAGGTGTGAA	ACATTTGAAA	GATATGCCAA	TTCIGCCGGG	AGAGATATTG	2000
ysGlyValLy	sHisLeuLys	AspMetProI	leLeuProGI	yGluIlePhe	
AAGTATAAAT	GGACAGTGAC	CGTAGAAGAT	GGACCAACTA	AATCAGATCC	2050
LysTyrLysT	rpThrValTh	rValGluAsp	GlyProThrL	ysSerAspPr	
TOGGTGCCTG	ACCGATATT	ACTCAAGCTT	CATTATCTTG	GAGAGAGATC	2100
oArgCysLeu	ThrArgTyrT	yrSerSerPh	eIleAsnLeu	GluArgAspL	
TAGCTTCAGG	ACTCATTGGC	CCTCTTCTCA	TCTGCTACAA	AGAATCTGTA	2150
euAlaSerGI	yLeuIleGly	ProLeuLeuI	leCysTyrLy	sGluSerVal	
GATCAAAGAG	GAAACCAGAT	GATGTCAGAC	AAGAGAAATG	TCATCCIGTT	2200
AspGlnArgG	lyAsnGlnMe	tMetSerAsp	LysArgAsnV	alIleLeuPh	
TTCIGTATTT	GATGAGAATC	GAAGCTGGTA	CCTCACAGAG	AATATGCAGC	2250
eSerValPhe	AspGluAsnA	rgSerTrpTy	rLeuThrGlu	AsnMetGlnA	
GCTTCCCTCC	CAATGCAGAT	GTAGTGCAGC	CCCATGACCC	AGAGTTCCAA	2300
rgPheLeuPr	oAsnAlaAsp	ValValGlnP	roHisAspPr	oGluPheGln	
CTCTCTAACA	TCATGCACAG	CATCAATGGC	TATGTTTTTG	ACAACTTGCA	2350
LeuSerAsnI	leMethHisSe	rIleAsnGly	TyrValPheA	spAsnLeuGI	
GCTGTACAGT	TGTTTGCAATG	AGGTGGCGTA	CIGGTACATT	CTAAGTGTTG	2400
nLeuSerVal	CysLeuHisG	luValAlaTy	rTrpTyrIle	LeuSerValG	
GAGCACAAC	TGACTTCCTG	TCGTCTCTCT	TCTCTGGATA	TACCTTCAA	2450
lyAlaGlnTh	rAspPheLeu	SerValPheP	heSerGlyTy	rThrPheLys	
CACAAAATGG	TCTATGAAGA	CACACTTACC	CCTCTCCCAT	TCTCAGGAGA	2500
HisLysMetV	alTyrGluAs	pThrLeuThr	LeuPheProP	heSerGlyGI	
AACTGTCTTC	ATGTCAATGG	AAAACCAGG	TCGTGGGGTT	CTGGGGTGCC	2550
uThrValPhe	MetSerMetG	luAsnProGI	yLeuTrpVal	LeuGlyCysH	
ACAATCAGA	CTTTCGGAC	AGAGGCATGA	CAGCCTTACT	GAAGGTTTCT	2600
isAsnSerAs	pPheArgAsn	ArgGlyMetT	hrAlaLeuLe	uLysValSer	
AGTGTGAACA	GGAACATTGA	TGATTATTAT	GAGGACACAT	ACGAAGATAT	2650
SerCysAsnA	rgAsnIleAs	pAspTyrTyr	GluAspThrT	yrGluAspIL	
TOCAACTUCC	CCTCTAAATG	AAAACAATGT	AATTAAACCT	AGAAGCTTCT	2700
eProThrPro	LeuLeuAsnG	luAsnAsnVa	lIleLysPro	ArgSerPheS	
CCAGAAATTC	AAGGCACCT	AGCACTAAGG	AAAAGCAATT	GAAAATGAAG	2750
erGlnAsnSe	rArgHisPro	SerThrLysG	luLysGlnLe	uLysMetLys	
AGAGAAGATT	TTCATCTTA	CGGCGACTAT	GAAAATCAGG	GCCTCCGCAG	2800
ArgGluAspP	heAspIleTy	rGlyAspTyr	GluAsnGlnG	lyLeuArgSe	
CTTTCAAAG	AAAACAGAC	ACTATTTCAT	TGCTGCAGTG	GAGCGTCTCT	2850
rPheGlnLys	LysThrArgH	isTyrPheIL	eAlaAlaVal	GluArgLeuT	

【図6-3】

(FIGURE 6.(cont.)

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
GGGATTATGG	GATGAGTAGA	TCCTCCATA	TACTAAGAAA	CAGGGCTCAA	2900
rpAspTyrGl	yMetSerArg	SerProHisI	leLeuArgAs	nArgAlaGln	
AGTGGGGATG	TCCAGCAGTT	CAAGAAGGIG	GTTTTCAGG	AAITTTACTGA	2950
SerGlyAspV	alGlnGlnPh	eLysLysVal	ValPheGlnG	luPheThrAs	
TGGATCCTTT	ACTCAGCCCT	TATACCGTGG	AGAATCAGAT	GAACACTTGG	3000
pGlySerPhe	ThrGlnProL	eTyrArgGl	yGluLeuAsn	GluHisLeuG	
GACTCTGGG	GCCATATATA	AGAGCACAAG	TIGAAGCAA	TATCGTGGTA	3050
lyLeuLeuGl	yProTyrLle	ArgAlaGluV	alGluAspAs	nLleValVal	
ACTTTCAAAA	AOCAGGCTC	TGGTCCCTAC	TCCTTCTATT	CTAGTCTTAT	3100
ThrPheLysA	snGlnAlaSe	rArgProTyr	SerPheTyrS	erSerLeuLl	
TTCTTATGAC	GAAGATGAGG	GACAAGGAGC	AGAACTAGA	AGAAAGTTTG	3150
eSerTyrAsp	GluAspGluG	lyGlnGlyAl	aGluProArg	ArgLysPheV	
TCAACCTTAA	TGAAACCAA	ATTTACTTIT	GGAAAGTGCA	GCATCATATG	3200
alAsnProAs	nGluThrLys	lLeyrPheT	rpLysValGl	nHisHisMet	
GCACCCACTA	AAGATGAGIT	TGACTGCCAA	GCTGGGCTT	ATTTTTCIGA	3250
AlaProThrL	ysAspGluPh	eAspCysLys	AlaTrpAlaT	yrPheSerAs	
TGTTGATTTG	GAGAAAGATG	TCCACTCAGG	CTTGATIGGA	CCCTTTCIGA	3300
pValAspLeu	GluLysAspV	alHisSerGl	yleLleGly	ProLeuLeuL	
TCIGCCGCAG	TAACACACTG	AAOCTGCTC	ATGGGAGACA	AGTGACAGTG	3350
leCysArgSe	rAsnThrLeu	AsnProAlaH	isGlyArgGl	nValThrVal	
CAGGAGTTTG	CCCTGGTTTT	CACTATATTG	GATGAGACTA	AGAGCTGGTA	3400
GlnGluPheA	laLeuValPh	eThrLlePhe	AspGluThrL	ysSerTrpLy	
CTTCACTGAA	AAOCTGGAAA	GGAACGTGAG	AGCTCCCTGC	AATGTCCAGA	3450
rPheThrGlu	AsnLeuGluA	rgAsnCysAr	gAlaProCys	AsnValGlnL	
AGGAGGACCC	TACTCTAAAA	GAAAACCTCC	GCCTCCATGC	AATCAAAGGC	3500
ysGluAspPr	oThrLeuLys	GluAsnPheA	rgPheHisAl	aLleAsnGly	
TATGTGAAGG	ATACACTCC	TGGCTTAGTA	ATGGCTCAGG	ATCAAAAGGT	3550
TyrVallLysA	spThrLeuPr	oGlyLeuVal	MetAlaGlnA	spGlnLysVa	
TOGATGGIAT	CTGCTCAGCA	TGGGCAGCAA	CGAAAACATT	CATTCCATTC	3600
lArgTrpTyr	LeuLeuSerM	etGlySerAs	nGluAsnLle	HisSerLleH	
ACTTCAGTGG	ACATGIGITC	ACTGTACGGA	AAAAAGAGCA	ATATAAAATG	3650
isPheSerGl	yHisValPhe	ThrValArgL	ysLysGluGl	uTyrLysMet	
GCAGICTACA	AOCTCTATCC	AGGIGTTTTT	GAGACTGIGG	AAATGCTACC	3700
AlaValTyrA	snLeuTyrPr	oGlyValPhe	GluThrValG	luMetLeuPr	
ATCCCAAGTT	GGAATCIGGC	GGATAGAATG	OCTTATCGGC	GAGCACTTGC	3750
oSerGlnVal	GlyLleTrpA	rgLleGluCy	sLleLleGly	GluHisLeuG	
AAGCGGGAT	GAGCACTCTG	TTCTCGGIGT	ACAGCAAGAA	GTGTCAGACT	3800
lnAlaGlyMe	tSerThrLeu	PheLeuValT	yrSerLysLy	sCysGlnThr	

【图6-4】

FIGURE 6 (cont.)

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
CCACTGGGGA	TGGCTTCGG	ACACATTAGA	GATTTTCAGA	TTACAGCTTC	3850
ProLeuGlyM	etAlaSerGl	yHisIleArg	AspPheGlnI	leThrAlaSe	
AGGACAATAT	GGACAGTGG	CCCCAAGCT	GGCCAGACTT	CATTATTTOG	3900
rGlyGlnTyr	GlyGlnTrpA	laProLysLe	uAlaArgLeu	HisTyrSerG	
GATCAATCAA	TGCTGGAGC	ACCAAGGATC	OCTTTTOCTG	GATCAAGGTG	3950
lySerIleAs	nAlaTrpSer	ThrLysAspP	roPheSerTr	pIleLysVal	
GATCTCTTGG	CAOCGATGAT	TATTCAOAGC	ATCATGAOCC	AGGGGGCCCG	4000
AspLeuLeuA	laProMetIl	eIleHisGly	IleMetThrG	InGlyAlaAr	
CCAGAAGTTC	TCCAGCCTCT	ACGIGICTCA	GTTTATCATC	ATGTACAGTC	4050
gGlnLysPhe	SerSerLeuT	yrValSerGl	nPheIleIle	MetTyrSerL	
TGGATGGCAA	CAAGTGGCAC	AGTTAOCGAG	GGATTCAC	GGGGAOCTTA	4100
euAspGlyAs	nLysTrpHis	SerTyrArgG	lyAsnSerTh	rGlyThrLeu	
ATGGICTTCT	TTGGCAACGT	GGATTCATCT	GGGATCAAAC	ACAATATTTT	4150
MetValPheP	heGlyAsnVa	lAspSerSer	GlyIleLySH	isAsnIlePh	
TAAOCTOOG	ATTATTGCTC	AGTACATOOG	TTTGCAOCCA	AOCATTACA	4200
eAsnProPro	IleIleAlaG	InTyrIleAr	gLeuHisPro	ThrHisTyrS	
GCATOCGCAG	CATCTTCGC	ATGGAGCTCT	TGGGCTGTGA	CTTCAACAGT	4250
erIleArgSe	rThrLeuArg	MetGluLeuL	euGlyCysAs	pPheAsnSer	
TGCAGCATGC	CGCTGGGGAT	GGAGAGTAAA	GCAATATCAG	ATGCCTCAGAT	4300
CysSerMetP	roLeuGlyMe	tGluSerLys	AlaIleSerA	spAlaGlnIl	
CACITGCTCG	TCTTACCTAA	GCAGTATGCT	TGCCACTTGG	TCTOCTTCCC	4350
eThrAlaSer	SerTyrLeuS	erSerMetLe	uAlaThrTrp	SerProSerG	
AAGOOOGGCT	GCACCIGCAG	GGCAGGACTA	ATGCCITGGAG	AOCCTCAGGCA	4400
InAlaArgLe	uHisLeuGln	GlyArgThrA	snAlaTrpAr	gProGlnAla	
AATAACCCAA	AAGAGTGGCT	GCAAGTGGAC	TTCCGGAAGA	CCATGAAAGT	4450
AsnAsnProL	ysGluTrpLe	uGlnValAsp	PheArgLysT	hdMetLysVa	
CACAGGAATA	AOCACCCAGG	GGTGAAATC	TCTCTCATC	AGCATGTATG	4500
lThrGlyIle	ThrThrGlnG	lyValLysSe	rLeuLeuIle	SerMetTyrV	
TGAAGGAGTT	OCTCATCTOC	AGTAGTCAAG	ATGGOCATAA	CTGGACTCTG	4550
allLysGluPh	eLeuIleSer	SerSerGlnA	spGlyHisAs	nTrpThrLeu	
TTTCTTCAGA	ATGGCAAAGT	CAAGGCTTTC	CAGGGAAACC	GGGACTOCTC	4600
PheLeuGlnA	snGlyLysVa	lLysValPhe	GlnGlyAsnA	rgAspSerSe	
CAOGCTGTG	CGGAACCGTC	TGGAACCCOC	GCTGGTGGCT	CGCTACGTGC	4650
rThrProVal	ArgAsnArgL	euGluProPr	oLeuValAla	ArgTyrValA	
GOCIGCAOCC	GCAGAGCTGG	GCGCACACA	TGGCCCTGAG	GCTGGAGGTC	4700
rgLeuHisPr	oGlnSerTrp	AlaHisHisI	leAlaLeuAr	gLeuGluVal	
CTGGGCTGGG	ACACCCAGCA	GCCCGOCTGA	CCCGOGCTC	TGCGGCCCTG	4750
LeuGlyCysA	spThrGlnGl	nProAla...			

【図6-5】

FIGURE 6 (cont.)

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
TETCCCCCTGC	CTCCCCGCCC	TGCCCCCGCG	GCTTCCATC	AAGCTTATCG	4800
ATACCGTCCA	GCGAGTTCCT	CTGAGGGGAT	GGCAATAAA	AAGACAGAAT	4850
AAAACGCACG	GGTGTGGGT	CGTTTGTTCG	GATCCAGATC	TAGGAACCCC	4900
TAGTGATGGA	GTGGCCACT	CCCTCTCTGC	GGCTGGCTC	GCTCACTGAG	4950
GGGCCCCGGG	CAAAGCCCCG	GGTGGGGGG	ACCTTTGGTC	GGGCGGCTC	5000
AGTGAGCGAG	CGAGCGGCA	GAGAGGGAGT	GGCAACCCC	CCCCCCCCC	5050
CCCCCTGCAGC	CCAGCTGCAT	TAATGAATCG	GCAACGGCG	GGGGAGAGGC	5100
GGTTTGGGTA	TGGGGGGCTC	TTGGGCTTC	TGGCTCACTG	ACTGGCTGG	5150
CTGGTGGTT	GGGCTGGGGC	GAGGGGTATC	AGCTCACTCA	AAGGGGGTAA	5200
TACGGTATC	CACAGAATCA	GGGGATAACG	CAGGAAGAA	CATGTGAGCA	5250
AAAGGOCAGC	AAAAGGOCAG	GAACGGTAAA	AAGGCGCGT	TGCTGGGGTT	5300
TTTCATAGG	CTGGGCCCC	CTGACGAGCA	TCACAAAAAT	CGACGCTCAA	5350
GTCAGGGTG	GCGAAACCG	ACAGGACTAT	AAAGATACCA	GGGTTTCCC	5400
CCTGGAGCT	CCCTGGTGG	CTCTCTGT	CGAACCTGC	CGCTTACGG	5450
ATACTGTC	GCTTCTCTC	CTTGGGAAG	CGTGGGCTT	TCTCAATGCT	5500
CAAGCTGTAG	GTATCTCAGT	TGGGTGTAGG	TGGTGGCTC	CAAGCTGGG	5550
TGTGTCACG	AAACCCCGT	TCAGCCGAC	CGCTGGGCT	TATCCGGTAA	5600
CTATGGCTT	GAGTCCACC	CGGTAAGACA	CGACTTATCG	CCACTGGCAG	5650
CAGCCACTGG	TACAGGATT	AGCAGAGCA	GGTATGTAGG	CGGTGCTACA	5700

【図6-6】

FIGURE 6 (cont.)

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
<u>GAGTTCCTTGA</u>	<u>AGTGGTGGCC</u>	<u>TAACTAOGGC</u>	<u>TACACTAGAA</u>	<u>GGACAGTATT</u>	5750
<u>TGGTATCTGC</u>	<u>GCTCTGCTGA</u>	<u>AGCCAGTTAC</u>	<u>CTTCGGAAAA</u>	<u>AGAGTTGGTA</u>	5800
<u>GCCTCTGATC</u>	<u>CGGCAAACAA</u>	<u>AOCACCGCTG</u>	<u>GTAGCGGTGG</u>	<u>TTTTTTTGT</u>	5850
<u>TGCAAGCAGC</u>	<u>AGATTACGG</u>	<u>CAGAAAAAAA</u>	<u>GGATCTCAAG</u>	<u>AAGATCCITT</u>	5900
<u>GATCTTTTCT</u>	<u>AOGGGGTCTG</u>	<u>AOGCTCAGTG</u>	<u>GAACGAAAAC</u>	<u>TCAOGTTAAG</u>	5950
<u>GGATTTTGGT</u>	<u>CATGAGATTA</u>	<u>TCAAAAAGGA</u>	<u>TCTTCAOCTA</u>	<u>GATCCTTTTA</u>	6000
<u>AATTAAAAAT</u>	<u>GAAGTTTTAA</u>	<u>ATCAATCTAA</u>	<u>AGTATATATG</u>	<u>AGTAAACTTG</u>	6050
<u>GTCIGACAGT</u>	<u>TACCAATGCT</u>	<u>TAATCAGTGA</u>	<u>GGCAOCTATC</u>	<u>TCAGOGATCT</u>	6100
	ylGelIreS	uel...siHo	rPlaV...gr	AueLreSgrA	
<u>GTCTATTTTCG</u>	<u>TTCATCCATA</u>	<u>GTTCOCTGAC</u>	<u>TCCCCGTCTG</u>	<u>GTAGATAACT</u>	6150
psAelIulGn	sAteMprTue	InlGgrAlaV	ylGgrAgrAr	hTreSueL..	
<u>ACGATAOGGG</u>	<u>AGGGCTTACC</u>	<u>ATCTGGCOOC</u>	<u>AGTCTGCAA</u>	<u>TGATAOOGG</u>	6200
.reSlaVorP	orPreSlaVt	eMnlGylGpr	TsiHnlGueL	reSlaValAu	
<u>AGAOCCAOGC</u>	<u>TCACCGGCTC</u>	<u>CAGATTITATC</u>	<u>AGCAATAAAC</u>	<u>CAGOCAGCOG</u>	6250
eLylGlaVre	SlaVorPulG	ueLnsAelIu	eLueLueLyl	GalAueLgrA	
<u>GAAGGGGOGA</u>	<u>GCGCAGAAGT</u>	<u>GGTCCTGCAA</u>	<u>CTTTATCOGC</u>	<u>CTCCATOCAG</u>	6300
ehPorPgrAa	lAsyCehPsi	HpsAnlGueL	syLelIgrAg	rAprTyIgrh	
<u>TCIATTAATT</u>	<u>GTTCOOGGGA</u>	<u>AGCTAGAGTA</u>	<u>AGTAGTTGCG</u>	<u>CAGTTAATAG</u>	6350
T.....nsA	nsAylGorPu	eL...ueLue	LryTnsAala	ueL...ryTh	
<u>TTTCGCAAC</u>	<u>GTGTGTGCA</u>	<u>TTCCTACAGG</u>	<u>CATGTGGTGG</u>	<u>TCACGCTCTG</u>	6400
sAalAsyCgr	AnlGnlGprT	nlG...ueLs	yCgrAorPrh	TlaVreShtT	
<u>OGTTTGGTAT</u>	<u>GGCTTCATTC</u>	<u>AGCTCOGGTT</u>	<u>CCCAACGATC</u>	<u>AAGGOGAGTT</u>	6450
rhThlGryTo	rPsyLteM..	.reSgrAnsA	ylGlaVelIu	eLalAueL..	
<u>ACATGATCCC</u>	<u>CCATGTGTGG</u>	<u>CAAAAAAGOG</u>	<u>GTTAGCTOCT</u>	<u>TOGGTCCTOC</u>	6500
.teMelIylG	prThhTrhTs	yCehPueLor	P...reSgrA	grApsAulGr	
<u>GATCGTTGTC</u>	<u>AGAAGTAAGT</u>	<u>TGGCOGCAGT</u>	<u>GTTATCACTC</u>	<u>ATGGTTATGG</u>	6550
eSgrAnlG..	.ehPryTrhT	orPgrAueLr	hTelIlaV..	.orP...orP	
<u>CAGCACIGCA</u>	<u>TAATTCCTCT</u>	<u>ACTGTGATGC</u>	<u>CATCOGTAAAG</u>	<u>ATGCTTTTCT</u>	6600
ueLlaValAr	yThsAulG..	.nlG...ala	teMgrAueLe	lIreSsyInl	
<u>GTCAGTGGTG</u>	<u>AGTACTCAAC</u>	<u>CAAGTCATTC</u>	<u>TGAGAATAGT</u>	<u>GTATGOGGCG</u>	6650
GreSnlGsiH	rhTreSueLp	rThhTtemGr	AueLelIcht	ryTalaAalAl	



【図6-7】

FIGURE 6 (cont.)

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
ACCGAGTTC	TCTTGCCCG	CGTCAATAC	GGATAATAC	GGCCACATA	6700
avreSnsAre	SsyLylGorP	rhTuelLaVo	rPryTryTgr	AalAlaVryT	
GCAGAACITTT	AAAAGTGTCT	ATCATTTGAA	AACGTTCTTC	GGGGCGAAAA	6750
syCehPsyLu	eLueLala...	...nlGehP	laVnsAsyLo	rPalAehPla	
CTCTCAAGGA	TCTTACCGCT	GTTGAGATCC	AGTTGATGT	AACCCACTCG	6800
VgrAueLreS	grAlaValAr	htreSelIpr	TnsAreSrtT	laVprTulGs	
TGCACCCAAC	TGATCTTCAG	CATCTTTTAC	TTTCAACAGC	GTTTCTGGGT	6850
ihlaVprTre	SelIsyLueL	teMsyL...s	yl...prTgr	AsyLnlgRht	
GAGCAAAAAC	AGGAAGGCAA	AATGCGGCAA	AAAAGGGAAT	AAGGGGACA	6900
uelLueLehPu	eLehPalAeh	PsiHgrAueL	ehPorPehPu	eLorPreSla	
CGGAAATGTT	GAATACATCAT	ACTCTTCCTT	TTTCAATATT	ATTGAAGCAT	6950
VreSelInsA	ehPlaV...l				
TTATCAGGGT	TATTGTCICA	TGAGCGGATA	CATATTTGAA	TGTATTTAGA	7000
AAAATAAACA	AATAGGGGTT	CGCGGCACAT	TTCCCGGAAA	AGTGCCAOCT	7050
GACGICTAAG	AAACATTAT	TATCATGACA	TTAACCTATA	AAAATAGGCG	7100
TATCAGGAG	CCCTTTGCTC	TGCGCGGTTT	CGGTGATGAC	GGTGAAAAC	7150
TCIGACACAT	GCAGCTCCCG	GAGACGGTCA	CAGCTTGCTT	GTAAGGGAT	7200
GGCGGGAGCA	GACAAGCCCG	TCAGGGGCG	TCAGGGGGTG	TTGGCGGGTG	7250
TGCGGGCIGG	CTTAACCTATG	CGGCATCAGA	GCAGATTGTA	CIGAGAGTGC	7300
AACATATGCG	GIGIGAAATA	CGGCACAGAT	GCGTAAGGAG	AAAATACCGC	7350
ATCAGGAAAT	TGTAAACGTT	AATATTTTGT	TAAAATTGCG	GTTAAATTTT	7400
TGTTAAATCA	GCTCATTTT	TAAACATAG	GCGAAATCG	GCAAAATCC	7450
TTATAAATCA	AAAGAATAGA	CGAGATAGG	GTTGAGTGTT	GTTCCAGTTT	7500
GGAACAAGAG	TCCACTATTA	AAGAAOGTGG	ACTCCAAOGT	CAAAGGGCGA	7550
AAAACCGTCT	ATCAGGGCGA	TGGCCCACTA	CGTGAACCAT	CACCCATAATC	7600

【図6-8】

FIGURE 6 (cont.)

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
<u>AAGTTTTT</u>	<u>TG GGGTCGAGGT</u>	<u>GOGTAAAGC</u>	<u>ACTAAATCGG</u>	<u>AAOCCFAAG</u>	7650
<u>GGAGOOOOOG</u>	<u>ATTTAGAGCT</u>	<u>TGAGGGGAA</u>	<u>AGOOGGOGAA</u>	<u>CGTGGGAGAA</u>	7700
<u>AAGGAAGGGA</u>	<u>AGAAAGOGAA</u>	<u>AGGAGOGGGC</u>	<u>GCTAGGGOGC</u>	<u>TGGCAAGTGT</u>	7750
<u>AGCGGTACAG</u>	<u>CTGGGGGTAA</u>	<u>CCAOCACAOC</u>	<u>CGOOGGGCTT</u>	<u>AATGGGOGGC</u>	7800
<u>TACAGGGOGC</u>	<u>GTGGGGOCAT</u>	<u>TGGGCAATCA</u>	<u>GGCTAAGCAA</u>	<u>CTGTTGGGAA</u>	7850
<u>GGGGGATCGG</u>	<u>TGGGGGCTC</u>	<u>TTGGCTATTA</u>	<u>CGGAGCTGG</u>	<u>CTGCAGGGGG</u>	7900
<u>GGGGGGGGGG</u>	<u>GGGT</u>				7914

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Appl. No.  
PCT/US 00/28221A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12N15/864 C12N15/12 C07K14/755 C12N15/36 C12N7/01  
C12N5/10 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category \* Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.

X	WO 98 09524 A (CHIRON CORP ; INDIANA UNIVERSITY (US)). 12 March 1998 (1998-03-12) page 7, paragraph 2 - page 8, paragraph 1, page 9, last paragraph	1-67
---	--	------

X	WO 97 45550 A (ALEMANY RAMON ; DAI YIFAN (US); ZHANG WEI WEI (US); AYARES DAVID (U)). 4 December 1997 (1997-12-04) the whole document	1-57
---	---	------

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

\*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 March 2001

Date of mailing of the international search report

16/03/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tlx 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Mandl, B

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intel. and Application No.  
PCT/US 00/28221

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GNATENKO D. V. ET AL.: "Human factor VIII can be packaged and functionally expressed in an adeno-associated virus background: Applicability to haemophilia A gene therapy." BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, vol. 104, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 27-36, XP000982772 ISSN: 0007-1048 the whole document	1,3-10, 13-17, 20-26, 29-44, 47-57
A	WANG L. ET AL.: "Sustained correction of bleeding disorder in hemophilia B mice by gene therapy." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 96, no. 7, 30 March 1999 (1999-03-30), pages 3906-3910, XP002162030 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-57
A	ILL C. R. ET AL.: "Optimization of the human factor VIII complementary DNA expression plasmid for gene therapy of hemophilia A" BLOOD COAGULATION & FIBRINOLYSIS, vol. 8, no. SUPPL. 02, December 1997 (1997-12), pages S23-S30, XP002098302 ISSN: 0957-5235 the whole document	1-57
P,X	WO 00 23116 A (COUTO LINDA B ;AVIGEN INC (US); COLOSI PETER C (US)) 27 April 2000 (2000-04-27) the whole document	1-57
P,X	WO 99 61642 A (CELL GENESYS INC) 2 December 1999 (1999-12-02) the whole document	1-57
P,X	CHAO H. ET AL.: "Sustained expression of human factor VIII in mice using a parvovirus-based vector." BLOOD, vol. 95, no. 5, 1 March 2000 (2000-03-01), pages 1594-1599, XP002162031 ISSN: 0006-4971 the whole document	1-67

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.  
PCT/US 00/28221

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9809524 A	12-03-1998	EP 0933997 A JP 2001500376 T	11-08-1999 16-01-2001
WO 9745550 A	04-12-1997	EP 0954591 A	10-11-1999
WO 0023116 A	27-04-2000	AU 1125600 A	08-05-2000
WO 9961642 A	02-12-1999	AU 4185799 A	13-12-1999

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N	1/19	C 1 2 N	1/21
	1/21		7/00
	5/10	C 1 2 R	1:93
	7/00	C 1 2 N	15/00
//(C 1 2 N	7/00		5/00
C 1 2 R	1:93)		Z N A A
			B
			A
(81) 指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72) 発明者	バースタイン, ヘイム アメリカ合衆国ワシントン州98052, レド モンド, ノース・イースト・シックスティ セカンド・ストリート 14104		
(72) 発明者	リンチ, カメル・エム アメリカ合衆国ワシントン州98028, ケン モア, セヴンティエイス・アヴェニュー, ノース・イースト 15016		
(72) 発明者	ステパン, アンソニー・エム アメリカ合衆国ワシントン州98116, シア トル, フォーティファースト・アヴェニュー, サウス・ウェスト 3211		
(72) 発明者	マンソン, キース アメリカ合衆国ワシントン州98103, シア トル, エヴァンストン・アヴェニュー 4422, エヌ#ビー		

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA04 DA02 EA02  
GA11 GA18  
4B065 AA93X AA93Y AB01 AC14  
BA02 CA24 CA44  
4C084 AA13 NA14 ZA532  
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14  
ZA53

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**